

00550

UNAM
POSGRADO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

11

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO DEL FUNCIONAMIENTO DE UNA CELDA DE
EXTRACCIÓN EN FLUJO PARA CONTAMINANTES
ORGÁNICOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS
P R E S E N T A

I.Q. Fernando Nonato Nonato

Tutor: Dra. Ma. del Pilar Cañizares Macías

México, D.F.

2002



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.

INDICE

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
OBJETIVOS	9
Capítulo 1	10
ANTECEDENTES	10
1.1 FUENTES DE CONTAMINACIÓN	10
1.2 PROPIEDADES DE LOS PAH's	11
1.2.1 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS	11
1.2.2 EFECTOS SOBRE LA SALUD DEL HOMBRE	14
1.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	15
1.3.1 EXTRACCIÓN SOXHLET	15
1.3.2 EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	16
1.3.3 EXTRACCIÓN ASISTIDA CON MICROONDAS	18
1.3.4 EXTRACCIÓN CON FLUIDOS PRESURIZADOS	21
1.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN PARA PAH's ASISTIDOS CON MICROONDAS	23
1.5 MÉTODOS EN LÍNEA PARA EXTRAER PAH's DE MATRICES SÓLIDAS	29

1.6 MÉTODOS DE FORTIFICACIÓN PARA PAH's.....	32
1.7 POTENCIAL DEL AGUA COMO DISOLVENTE EXTRACTANTE	
DE COMPUESTOS ORGÁNICOS.....	34
1.7.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DISCONTINUOS.....	35
1.7.1.1 EXTRACCIÓN DISCONTINUA CONVENCIONAL.....	35
1.7.1.2 EXTRACCIÓN DISCONTINUA ASISTIDA CON FUENTES DE	
ENERGÍA.....	35
1.7.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DISCONTINUOS-	
CONTINUOS.....	36
1.7.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN CONTINUOS.....	37
1.7.3.1 LIXIVIACIÓN CONTINUA ASISTIDA CON ULTRASONIDO.....	37
1.7.3.2 LIXIVIACIÓN CONTINUA ASISTIDA CON PRESIÓN Y	
TEMPERATURA ELEVADAS.....	38
Capítulo 2.....	40
METODOLOGÍA.....	40
2.1 EQUIPO, INSTRUMENTOS Y ACCESORIOS.....	40
2.1.1 EQUIPO.....	40
2.1.2 INSTRUMENTOS.....	40
2.1.3 ACCESORIOS.....	40
2.1.4 REACTIVOS.....	40
2.2 DESCRIPCIÓN DE LA CELDA DE EXTRACCIÓN.....	41
2.3 MÉTODOS DE FORTIFICACIÓN.....	42
2.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	44
2.5 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN.....	47

Capítulo 3	48
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	48
3.1 MÉTODOS DE FORTIFICACIÓN DE TIERRAS DIATOMÁCEAS	48
3.2 CONDICIONES ÓPTIMAS DE EXTRACCIÓN	53
3.2.1 DISOLVENTE EXTRACTANTE / MEZCLA DE DISOLVENTES EXTRACTANTES	53
3.2.2 CONDICIONES ÓPTIMAS DE EXTRACCIÓN: POTENCIA, TIEMPO DE IRRADIACIÓN Y RELACIÓN DE DISOLVENTES	55
3.3 EXTRACCIONES CON LA CELDA DE EXTRACCIÓN EN FLUJO	58
3.3.1 EXTRACCIONES CON EL MÉTODO DE FORTIFICACIÓN EN ROTAVAPOR (Método 5)	59
3.3.2 EXTRACCIONES CON EL MÉTODO DE FORTIFICACIÓN EN REPOSO	61
3.3.2.1 EXTRACCIONES UTILIZANDO HEXANO:ETANOL (4:1) COMO MEZCLA EXTRACTANTE	62
3.3.2.2 EXTRACCIONES UTILIZANDO AGUA COMO DISOLVENTE EXTRACTANTE	63
3.3.2.3 EXTRACCIONES UTILIZANDO HEXANO COMO DISOLVENTE EXTRACTANTE	66
3.3.2.4 EXTRACCIONES CON SOXHLET	69
3.3.2.5 COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	70
3.4 REPRODUCIBILIDAD DEL SISTEMA DE EXTRACCIÓN	72
3.4.1 REPRODUCIBILIDAD EN EL CALENTAMIENTO DEL SISTEMA	73
3.4.2 REPRODUCIBILIDAD DEL SISTEMA DE EXTRACCIÓN	75
3.4.3 RECUPERACIONES DE EXTRACCIONES SOBRE MUESTRAS FORTIFICADAS CON DIFERENTES CANTIDADES DE FLUORENO	77

3.4.4 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DEL FLUORENO.....	79
3.4.4.1 ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL FLUORENO SIN UTILIZAR TIERRAS DIATOMÁCEAS.....	79
3.4.4.2 ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL FLUORENO UTILIZANDO TIERRAS DIATOMÁCEAS.....	81
3.5 EXTRACCIONES EN MUESTRAS FORTIFICADAS CON PIRENO.....	85
CONCLUSIONES.....	90
Anexo.....	92
VENTAJAS DE LA CELDA DE EXTRACCIÓN.....	92
REFERENCIAS.....	94

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

FIA	análisis por inyección en flujo
MAE	extracción asistida con microondas
PAH's	hidrocarburos policíclicos aromáticos
PCB's	bifenilos policlorados
PFE	extracción con fluidos presurizados
SFE	extracción con fluidos supercríticos
%RSD	desviación estándar relativa, en porciento
UV	ultravioleta

RESUMEN

La mayor parte de los nuevos métodos de lixiviación para hacer análisis cuantitativo de compuestos orgánicos lo constituyen principalmente las siguientes técnicas: Extracción con Ondas de Microondas, Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE) y Extracción con Ondas de Ultrasonido. Todas estas técnicas son del tipo discontinuo o por lote y requieren de manipulación de la muestra por parte del analista; este último factor es crítico ya que puede afectar la reproducibilidad del sistema de extracción o se pueden contaminar los extractos, afectando así al resultado final de análisis. A fin de evitar lo anterior, se utilizó una celda de flujo para extraer fluoreno a partir de muestras sintéticas preparadas con tierras diatomáceas. El estudio se inició probando tres métodos de fortificación (fortificación en rotavapor, fortificación manual y fortificación en reposo) con la finalidad de obtener muestras homogéneas en cuanto a la composición de fluoreno. Los resultados de las extracciones realizadas con mezcla hexano:etanol (1:1) y agua como disolventes extractantes mostraron poca reproducibilidad en la recuperación, resultado de la inestabilidad del fluoreno. En una parte posterior del trabajo se hizo un estudio de la reproducibilidad del sistema de extracción, así como también se estudió la estabilidad de los cuatro PAH's, fenantreno, fluoranteno y pireno, incluyendo al fluoreno. Los resultados de esta parte del estudio demuestran que el sistema de extracción es reproducible y que los PAH's: pireno y fluoranteno resultaron ser compuestos estables, confirmándose además la inestabilidad del fluoreno y fenantreno. Por último, se llevaron a cabo extracciones en muestras fortificadas con pireno, utilizando una mezcla hexano:etanol (4:1), agua y hexano como disolventes extractantes. Este estudio final demuestra la efectividad de la celda de flujo para extraer PAH's con recuperaciones mayores al 90% y porcentajes de RSD menores o iguales al 10%. No obstante, y la gran variabilidad en las recuperaciones, los estudios de extracción con agua para el caso de fluoreno demuestran el potencial de éste como disolvente extractante, comparado con los resultados obtenidos con soxhlet.

INTRODUCCIÓN

El método soxhlet convencional se ha venido utilizando desde hace un siglo para la extracción de componentes orgánicos de matrices sólidas. Su todavía vigencia, no sólo como técnica extractante, sino también como método de referencia para las demás técnicas de extracción, se debe a que es un método reconocido por su buena reproducibilidad y cuantitatividad. No obstante, hoy en día dichas ventajas reconocidas en el soxhlet no son suficientes ya que la necesidad de contar con técnicas rápidas, automatizadas y económicas es cada vez más creciente. Es así que se han desarrollado nuevas técnicas de extracción como: extracción con ultrasonido, extracción con fluidos supercríticos, extracción con fluidos presurizados y extracción asistida con microondas, las cuales en su mayoría han acelerado notablemente el proceso de extracción con recuperaciones comparables a las obtenidas con el soxhlet. En la mayoría de estas técnicas además se ha logrado disminuir los volúmenes de disolvente extractante, inclusive la extracción con fluidos supercríticos ha sustituido los disolventes por CO₂ como fluido supercrítico el cual es menos tóxico y más amigable con el medio ambiente. El costo inicial del equipo de los nuevos métodos de extracción es mucho mayor que el soxhlet; sin embargo, a la larga son más económicos por el ahorro de tiempo y disolventes.

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH's) están considerados como contaminantes del medio ambiente, los cuales se generan a partir de varias fuentes. Una de las fuentes principales de los PAH's se debe a la combustión incompleta de combustibles fósiles en automotores y plantas termoeléctricas. Debido al potencial de estos compuestos como agentes mutagénicos y carcinogénicos, el nivel de los PAH's tiene que monitorearse continuamente en una variedad de matrices, incluyendo: aire, agua, sólidos/sedimentos y tejidos de plantas. El monitoreo implica utilizar métodos de análisis ya establecidos; no obstante, estos métodos, aunque confiables, son tediosos, tardados, netamente manuales y utilizan grandes volúmenes de disolvente, algunos de los cuales son tóxicos. Es así, que se han venido desarrollando nuevos métodos de extracción más rápidos, automatizados y más económicos que abatan las desventajas ya mencionadas.

En lo que respecta a los métodos de extracción en discontinuo asistidos con microondas para extraer PAH's, se encuentran una gran cantidad de éstos reportados en la literatura, los cuales en promedio reducen grandemente el periodo de la extracción de 10 hrs. a 20 minutos comparados con el soxhlet, así también como la disminución de disolvente de 120 a 40 mL. En lo que respecta a los métodos de extracción para PAH's en línea, son pocos los que se reportan en la literatura; esto se debe a la dificultad para mantener la celda de extracción a presiones elevadas mientras se evacua el disolvente a presión atmosférica, aunque esto se ha logrado superar con el uso de restrictores (utilizados en la técnica de extracción con fluidos supercríticos), colocados en la entrada y salida de la celda, los cuales mantienen a la celda a presiones elevadas.

Las ventajas de poder utilizar agua como disolvente extractante en sustitución de cualquier disolvente orgánico son muchas, dos de las cuales son: es el disolvente más económico y es un disolvente limpio; es decir, es un disolvente que no contamina al medio ambiente ni al hombre. La principal desventaja del agua como disolvente extractante de compuestos orgánicos es su baja capacidad para disolverlos bajo condiciones normales; sin embargo, a temperaturas y presiones elevadas el agua posee propiedades muy similares a la de los disolventes orgánicos, haciéndola viable para utilizarla como disolvente extractante. No obstante, se deben utilizar materiales lo bastante inertes debido al gran poder corrosivo del agua a elevadas temperaturas.

En este trabajo se propone un sistema de extracción en línea para los PAH's en suelos, el cual con ciertos aditamentos puede acoplarse al sistema de medición para la cuantificación de los mismos. La importancia de diseñar una celda de extracción en flujo es que con ésta habrá una manipulación mínima de la muestra, que es básicamente la introducción de la muestra al sistema; se utilizarán pequeñas cantidades de disolvente (9 mL) y, dado que la celda es de teflón podrá ser utilizada para hacer extracciones con agua a elevadas temperaturas sin que se presenten problemas de degradación de la misma.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el funcionamiento de una celda de extracción, diseñada para realizar extracciones líquido/sólido en línea, de contaminantes orgánicos asistida por microondas. Para poder llevar a cabo este objetivo se utilizaron tierras diatomáceas fortificadas por diferentes métodos y PAH's (fluoreno y pireno).

OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ Probar varios métodos de fortificación de fluoreno en tierras diatomáceas como soporte para encontrar el método más versátil y que de resultados más reproducibles en cuanto a la homogeneidad de la composición.
- ◆ Optimizar las condiciones de extracción probando varios disolventes y con diferentes tiempos y potencias de irradiación para encontrar las condiciones menos drásticas para la celda.
- ◆ Llevar a cabo extracciones en la celda de extracción utilizando varios disolventes, incluyendo agua, para comparar eficiencias entre uno y otro disolvente; así como, la comparación de las eficiencias alcanzadas con la celda de extracción con la extracción soxhlet como método de referencia.

Capítulo 1

ANTECEDENTES

1.1 FUENTES DE CONTAMINACIÓN.

Los hidrocarburos en general son introducidos al ambiente por fuentes naturales y antropogénicas. Entre las fuentes naturales se encuentran: descomposición microbiana, incendios forestales y gas natural. De acuerdo con una publicación en *Science*¹, la emisión natural de hidrocarburos está estimada entre 30 y 60 millones de toneladas métricas anuales. Las emisiones antropogénicas de hidrocarburos se deben principalmente a la combustión incompleta de combustibles fósiles (automotores y termoeléctricas) y a la evaporación de combustibles líquidos y disolventes durante su almacenamiento, refinación y manejo²⁻⁷. Otras fuentes incluyen prácticas de quemado en la agricultura y lodos producidos en las plantas de tratamiento de aguas residuales⁸.

El tipo de hidrocarburos emitidos de los escapes de automotores varía con el tipo de combustible, el tipo de combustión (externa o interna) y la presencia o ausencia de dispositivos para abatir la contaminación. En general, prevalecen compuestos alifáticos de bajo peso molecular, olefinicos y compuestos aromáticos, algunos de los cuales se forman durante la combustión. Entre 500 y 800° C, las olefinas y dienos tienden a polimerizarse vía formación de radicales libres para formar PAH's⁹. Se ha reportado que el fluoreno, la 9-fluorenona y las alquilfluorenonas son los principales PAH's emitidos de motores diesel y gasolina¹⁰. La aromatización también puede ocurrir a bajas temperaturas (100 – 150° C) pero se requiere mucho tiempo, dando origen a grandes cantidades de PAH's alquilados. Este es el caso de la formación de combustibles fósiles, resultado de la degradación del material orgánico durante periodos de miles de años¹².

Uno de los problemas realmente serios en las plantas de tratamiento de aguas residuales es la utilización de los lodos que se generan en grandes cantidades durante el tratamiento. Un método económico para la utilización de estos lodos es como abono en la agricultura por su alto contenido de materia orgánica y también como material de relleno en

construcciones. Sin embargo, la utilización de estos residuos causa la liberación al ambiente de sustancias tóxicas tales como: metales pesados (Pb, Cd, Cr, Cu, Ni, Hg y Zn) y compuestos orgánicos (PAH's y sus derivados). Las fuentes principales de los PAH's en las aguas residuales son: aguas industriales, desechos domésticos, lluvias, precipitación de partículas contaminantes del aire, productos de abrasión de llantas en la superficie de las carreteras y también la biotransformación de materia orgánica a PAH's. En el tratamiento de las aguas, los PAH's son removidos en su mayoría (arriba del 90%) y concentrados en los lodos debido a la baja solubilidad de éstos en el agua y a la alta adsorción sobre partículas sólidas. La concentración de los PAH's en los diferentes tipos de lodos varía en el intervalo de varios microgramos a cerca de 2 grs./Kg de lodo seco⁸.

1.2 PROPIEDADES DE LOS PAH's.

1.2.1 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS.

Los PAH's son compuestos formados por anillos fusionados de benceno en la mayor parte de su estructura. Algunas de las propiedades más importantes como: punto de fusión (pf), punto de ebullición y solubilidad en agua de los PAH's utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla 1. Asimismo, las estructuras de los PAH's se muestran en la Figura 1.

Tabla 1. Propiedades físicas más importantes de los PAH's utilizados en este trabajo^a.

COMPUESTO	PUNTO DE FUSIÓN (°C)	PUNTO DE EBULLICIÓN (°C)	SOLUBILIDAD EN AGUA (µg/L) ¹¹
Fenantreno	101	340	1,290
Fluoranteno	109-111	384	260
Fluoreno	116	293	1,980
Pireno	156	404	135

^a La solubilidad esta referida a 25° C.

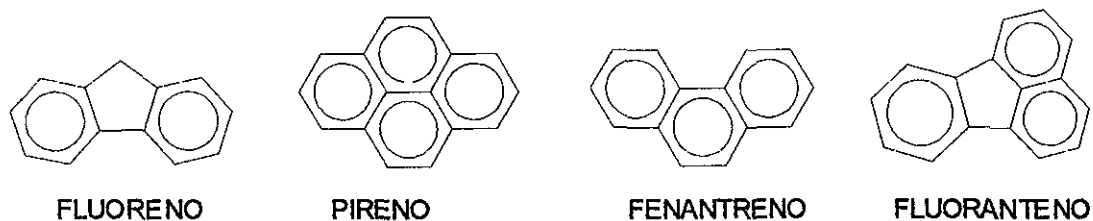


Figura 1. Estructuras químicas de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH's).

Cuando los PAH's reaccionan, tienden a retener el sistema de anillos conjugados para formación de derivados por sustitución electrofílica más que por adición. La oxidación de PAH's a endoperóxidos es particularmente relevante en posibles pérdidas durante el análisis¹¹. Ha habido varias publicaciones de transformaciones fotoquímicas cuando los PAH's se absorben sobre una variedad de materiales de soporte tales como partículas de carbón y medios cromatográficos^{19, 20, 22, 23}. Por ejemplo, es muy conocida la fotooxidación de antraceno adsorbido sobre alúmina y sílica gel por luz UV¹⁹.

Los PAH's con sustituyentes polares han sido encontrados en aguas naturales mientras que los PAH's menos polares son contaminantes de sedimentos, sólidos y lodos¹³. En la troposfera baja, los PAH's ligeros (antraceno y fluoreno) residen principalmente en la fase gaseosa a la temperatura ambiente; sin embargo, como la temperatura decrece a mayores alturas, empiezan a adsorberse pequeñas cantidades de PAH's sobre las partículas atmosféricas²¹. A niveles altos de la troposfera, la luz contiene un porcentaje alto de radiación UV, lo que puede ocasionar transformaciones fotoquímicas de los PAH's en la interfase gas/partícula las cuales juegan un rol importante en el control de los contaminantes antropogénicos.

El fluoreno, ha sido conocido como un tóxico y contaminante importante en la naturaleza. De aquí que la US EPA lo haya designado como un contaminante prioritario. El fluoreno y sus derivados han sido encontrados en el aire como vapor y adsorbidos sobre partículas sólidas¹⁴⁻¹⁶. La mayoría del fluoreno adsorbido se acumula sobre la tierra debido a la lluvia que lo arrastra o a la depositación de partículas atmosféricas. Varios

investigadores han reportado que el fluoreno predomina en sedimentos, pescado y plantas¹⁷,¹⁸, indicando esto su estabilidad en el ambiente.

Se ha observado que el fluoreno cuando se adsorbe sobre diferentes sustratos de partículas atmosféricas tiene diferentes vidas medias fotolíticas de 110 hrs. (sílica gel), 62 hrs. (alúmina), 37 hrs. (cenizas ligeras) y más de 1000 hrs. (carbón)¹⁹. Bajo irradiación de luz UV y en la presencia de NO_x, el fluoreno puede nitrarse y transformarse en compuestos mutagénicos tales como: 1-, 2-, 3- y 4-nitrofluorenos. Además, la 9-fluorenona el cual es todavía más tóxica que el fluoreno se forma como producto principal¹⁴.

Como ya se había mencionado, los PAH's ligeros como el antraceno y el fluoreno se encuentran adsorbidos en partículas suspendidas en el aire. De aquí que la mayor parte de las investigaciones hechas para estos dos compuestos se hagan en cuanto a las reacciones fotoquímicas que sufren dichos compuestos adsorbidos en diferentes tipos de partículas ligeras y en presencia de radiación UV al aire libre. Por otra parte, los PAH's que son arrastrados por la lluvia y debido a su carácter hidrofóbico tienden a acumularse en los sedimentos de ríos, lagos y mares. En general, los PAH's de bajo peso molecular son susceptibles a la biodegradación; sin embargo, los PAH's de alto peso molecular los cuales son altamente mutagénicos y carcinogénicos permanecen recalcitrantes sobre los sedimentos²⁴. El pireno es un importante agente mutagénico, mientras que el fenantreno, fluoranteno y los metabolitos de ambos, no son exactamente agentes tóxicos, carcinogénicos o mutagénicos. De aquí que tanto el fenantreno como el fluoranteno se usen como contaminantes modelo en estudios ambientales²⁶.

Tres de los PAH's utilizados en este trabajo, fenantreno, fluoranteno y pireno, están considerados como PAH's que permanecen adsorbidos a sedimentos de ríos, lagos y mares. Esto se constata debido a que los estudios de degradación encontrados en la literatura son: fotooxidaciones y biodegradaciones de estos PAH's adsorbidos en diferentes tipos de sedimentos inmersos en medios acuosos²⁴⁻²⁹.

1.2.2 EFECTOS SOBRE LA SALUD DEL HOMBRE.

Los PAH's son compuestos tóxicos, muchos de los cuales son carcinogénicos. El efecto de los PAH's carcinogénicos está relacionado con el tamaño de las partículas con las cuales están asociadas. Las partículas de 1 μm de diámetro o menos, penetran en los pulmones, ahí los PAH's son desadsorbidos y activados como carcinógenos por el sistema pulmonar P-450 o entran al sistema circulatorio. Las partículas más grandes (2-5 μm) no alcanzan los alvéolos ya que son expelidas por la mucosidad hacia la cavidad oral, donde son tragados. En este caso, los PAH's entran a la circulación por la vía gastrointestinal. Además, las partículas generadas en zonas urbanas cargadas con PAH's, adsorbidos sobre tierra o agua probablemente entren por la vía de la cadena alimenticia³⁰.

Por otro lado, las personas en ciertas ocupaciones, tales como los trabajadores en hornos de carbón, están expuestos a grandes dosis de PAH's, ya que su exposición excede a la de las personas con actividades ordinarias por un factor de 30,000 o más³⁰.

En cuanto a los PAH's estudiados en este trabajo, no hay una clasificación clara en cuanto a sus propiedades tóxicas. Sólo se puede decir que los PAH's estudiados aquí están dentro de los 16 PAH's considerados por la US EPA como contaminantes prioritarios. Para el caso del fluoreno no se mencionan propiedades adversas a la salud humana pero se forman en gran porcentaje en la combustión de gasolinas. En cuanto al fenantreno y fluoranteno estos se utilizan más bien como PAH's modelo de estudios ambientales²⁶, mientras que el pireno si posee propiedades mutagénicas³¹.

1.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.

La extracción es una de las etapas cruciales del análisis de una muestra. La extracción de compuestos orgánicos (PAH's, PCB's y pesticidas) de matrices sólidas se lleva a cabo comúnmente con disolventes orgánicos. La técnica de extracción soxhlet, introducida por Franz Von Soxhlet hace un siglo, continua siendo en la actualidad una de las técnicas de extracción más utilizadas. Han sido desarrolladas técnicas de extracción modernas y más costosas, pero no siempre más eficientes. Estas técnicas; sin embargo, poseen ciertas ventajas, incluyendo rapidez y reducción en el consumo de disolventes. Éstas también usan disolventes menos peligrosos para el medio ambiente, ofrecen mejores posibilidades para controlar la extracción y se tiene la posibilidad de acoplar la extracción en línea con otras técnicas analíticas. A continuación se describe el funcionamiento de algunas de las técnicas modernas más importantes de extracción líquido/sólido, además de la extracción soxhlet.

1.3.1 EXTRACCIÓN SOXHLET.

La extracción soxhlet es una técnica que normalmente requiere grandes cantidades de disolvente (superior a 150 mL) el cual hierve a reflujo sobre la muestra sólida entre 6 y 24 hrs. Aunque se pueden extraer varias muestras simultáneamente con esta técnica, se requiere de un trabajo intenso por parte del analista al inicio y al final, además del período de tiempo tan grande para completar la extracción.

En el soxhlet convencional, la muestra sólida se coloca en la cavidad la cual se llena gradualmente con el disolvente extractante por condensación de los vapores provenientes del matraz de destilación. Cuando el líquido alcanza un nivel predeterminado, un sifón aspira el contenido de la cavidad y lo descarga al matraz de destilación, arrastrando consigo parte de los analitos contenidos en la muestra. Este operación se repite hasta que virtualmente todo los analitos se arrastran al matraz de destilación. Ya que el disolvente actúa por pasos, el sistema puede considerarse como una extracción discontinua o por lote;

sin embargo, ya que el disolvente se recircula a través de la muestra también se considera esta técnica como un sistema continuo. De aquí que el soxhlet esté considerado como un sistema de extracción híbrido. Las ventajas más sobresalientes del soxhlet convencional son: (a) la muestra está en continuo contacto con porciones frescas de disolvente, lo cual favorece el desplazamiento del analito hacia el disolvente; (b) la temperatura del sistema es más alta que la temperatura ambiente ya que parte del calor aplicado al matraz de destilación se transmite a la cavidad del soxhlet; (c) no se requiere de una etapa de filtración. La desventaja de esta técnica es la incapacidad de proveer agitación lo cual ayudaría a acelerar el proceso de extracción y disminuiría el tiempo de extracción³².

1.3.2 EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.

Los problemas que se presentan en las técnicas convencionales como: tiempo consumido, técnicas netamente manuales y grandes cantidades de disolventes tóxicos, ha propiciado a los investigadores a buscar y a desarrollar técnicas nuevas de extracción o variantes de los métodos convencionales. Estas nuevas técnicas son en su mayoría técnicas de extracción instrumentales. La primera de este tipo de técnicas apareció como extracción con fluidos supercríticos (SFE, por sus siglas en inglés: Supercritical Fluid Extraction) y tuvo su auge a finales de los 80's y principios de los 90's en áreas tales como: ambiental, farmacéutico, polímeros, y especialmente en análisis de alimentos³³. En la Figura 2 se muestra un diagrama esquemático de un sistema SFE. Esta técnica aprovecha las propiedades como gas y como líquido de los fluidos supercríticos, básicamente CO₂, para extraer analitos orgánicos de matrices sólidas a temperaturas mayores a 31.1° C y a 74.8 atmósferas de presión. Uno de los problemas de esta técnica es su incapacidad para extraer compuestos polares debido a la baja constante dieléctrica del CO₂, para resolver este problema es necesario agregar modificadores orgánicos como metanol. El sistema básicamente funciona de la siguiente manera: (a) la muestra sólida se coloca en la celda de extracción; (b) se bombea CO₂ proveniente de un tanque hacia la celda de extracción; (c) a la par del paso anterior se calienta el horno donde se localiza la celda de extracción; (d) el

CO₂ que emerge de la celda a través de un restrictor, se burbujea hacia un vial con un volumen determinado de disolvente para atrapar los analitos; como paso opcional, el sistema puede contar con una bomba para la adición de un modificador mezclando éste con el CO₂ que es bombeado hacia la celda.

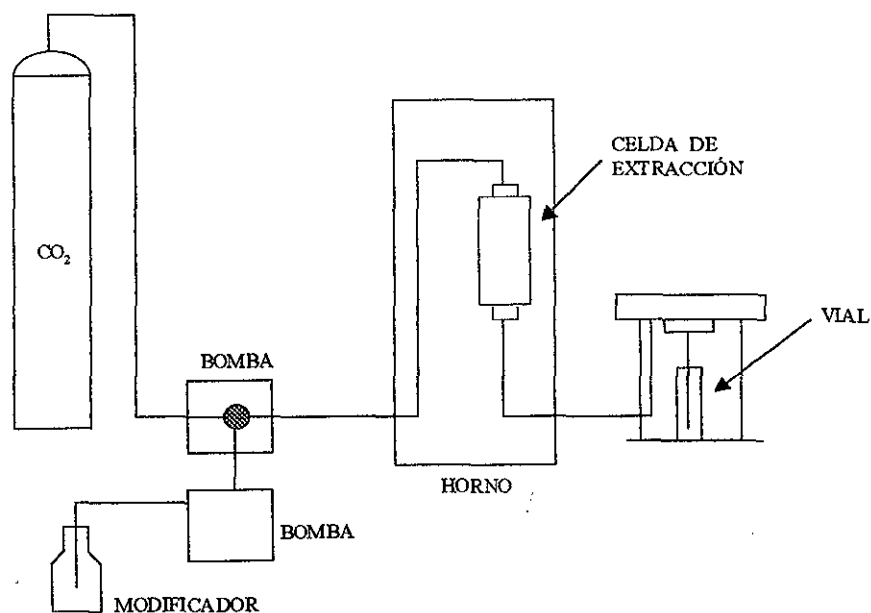


Figura 2. Diagrama esquemático de un sistema SFE.

Entre las ventajas más importantes de este sistema de extracción se encuentran: el agente extractante (CO₂) tiene baja toxicidad y químicamente es inerte; no se requiere etapa de preconcentración ya que el CO₂ es eliminado y los analitos son concentrados en poca cantidad de disolvente; selectividad, esta técnica permite la extracción selectiva de un amplio intervalo de analitos (PAH's, PCB's y compuestos organoclorados)³⁴; es una técnica limpia y segura ya que el CO₂ no es tóxico, no es inflamable y es más limpio que los disolventes utilizados en otras técnicas (hexano, éter, cloruro de metileno).

La extracción con fluidos supercríticos, cuyos beneficios más importantes han sido descritos, también muestra importantes limitaciones. La principales desventajas de esta

técnica son la dificultad para extraer analitos polares y las diferentes eficiencias de extracción en muestras naturales o sintéticas³³.

1.3.3 EXTRACCIÓN ASISTIDA CON MICROONDAS.

Esta técnica apareció en 1986 como extracción con horno de microondas (MAE, por sus siglas en inglés: Microwave-Assisted Extraction). En este sistema de extracción, el disolvente orgánico y la muestra se irradian con microondas a través de un dispositivo que las genera el cual recibe el nombre de magnetrón. Hay dos modalidades de este tipo de extracción, ya sea que se utilicen vasos sellados donde se ponen muestra y disolvente, en cuyo caso se habla de sistemas presurizados (Figura 3) y los hornos que trabajan a presión atmosférica con vasos abiertos llamados sistemas atmosféricos (Figura 4). La principal limitación de este tipo de técnica es la necesidad para remover físicamente el disolvente de la muestra previo al análisis del extracto.

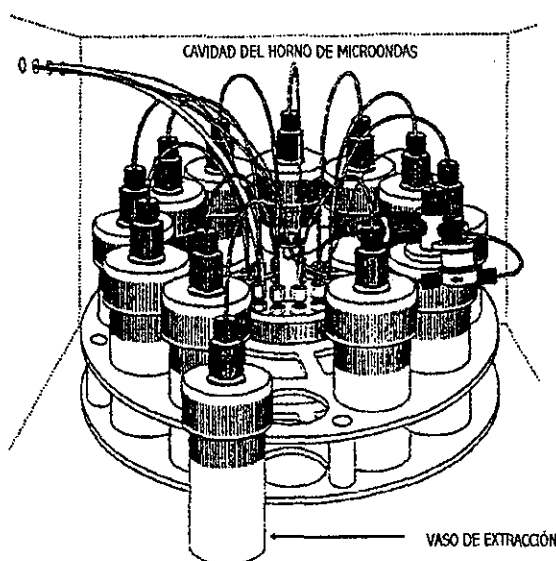


Figura 3. Horno de microondas presurizado.

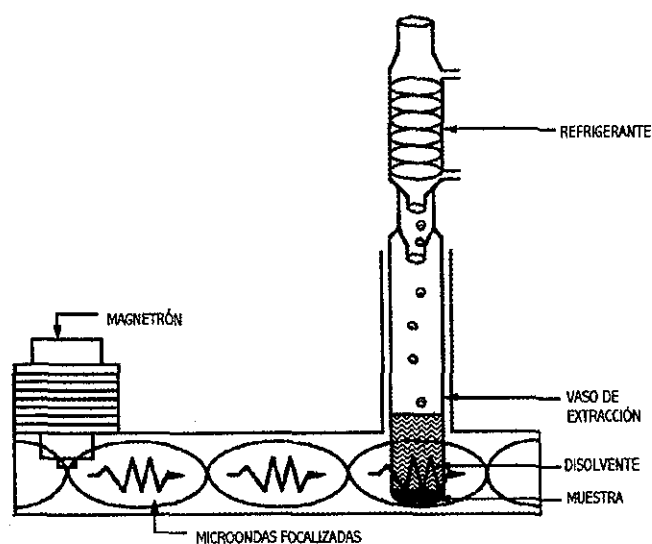


Figura 4. Horno de microondas atmosférico.

El principio de operación de esta técnica es el siguiente: las ondas electromagnéticas con una frecuencia de 2450 MHz (12.2 cm de longitud de onda) tienen la propiedad de que su campo eléctrico es capaz de hacer rotar a las moléculas polares como el agua así como también puede hacer migrar a las moléculas iónicas en disolución. Esta energía cinética de rotación y/o migración se transforma en energía térmica que se propaga a todo el medio circundante de las moléculas polares o iónicas. De esta manera las ondas de microondas se aprovechan como medio de calentamiento en el hogar y en el laboratorio para fines analíticos. El aparato que genera las microondas por medio de un magnetrón, el cual funciona con corriente eléctrica, es el horno de microondas. En el laboratorio, el horno de microondas es un aparato mucho más sofisticado que el horno casero sobre todo en lo que se refiere a dispositivos de seguridad. Este tiene múltiples usos en el laboratorio³⁵⁻³⁸, tales como digestiones ácidas para el análisis de metales, hidrólisis de proteínas y péptidos para el análisis de proteínas, extracciones con disolventes orgánicos, determinación de humedad en muestras sólidas, síntesis orgánica y calcinación.

La absorción de la energía de microondas ocurre por dos mecanismos: rotación dipolar y conducción iónica. El primer mecanismo se lleva a cabo con moléculas polares, mientras que el segundo se lleva a cabo con iones. Se puede deducir de los dos mecanismos anteriores, que el requisito para que las ondas sean adsorbidas es que las sustancias estén cargadas o posean al menos un momento dipolar como es el caso de las moléculas del agua. La propiedad física que se relaciona con el grado de polaridad de un compuesto es la constante dieléctrica ya que mientras más grande sea ésta, mayor es el momento dipolar de la sustancia. De aquí que disolventes como: hexano, tetracloruro de carbono y benceno no puedan ser calentados por que tienen una constante dieléctrica baja. Este mismo principio se aplica para encontrar el tipo de materiales que se usan en la construcción de los recipientes que contengan las muestras, los cuales deben permitir pasar libremente las microondas para que interaccionen con la muestra. Uno de los materiales más utilizados para la construcción de recipientes y celdas para horno de microondas es el teflón el cual es relativamente transparente a las microondas. Además este material tiene una cualidad muy importante, la resistencia química, ya que al ser un material bastante inerte es posible trabajar con una diversidad de sustancias como ácidos y disolventes orgánicos.

En el presente, un número limitado de fabricantes proveen hornos de microondas especialmente diseñados para utilizarlos en el laboratorio. Sin embargo, los trabajos iniciales con fines analíticos se realizaron en hornos de microondas caseros. Generalmente los hornos de microondas pueden dividirse en dos categorías: sistema cerrado (trabaja a altas presiones y temperaturas) y sistema abierto (trabaja a presión atmosférica). Para el caso de los sistemas que trabajan a presión atmosférica, estos generan una energía de 300 Watts al 100% de potencia. Estos pueden operar con incrementos de porcentaje de potencia de 0 a 100% para diferentes intervalos de tiempo. También se pueden irradiar varios recipientes de manera simultánea. Estos recipientes son tubos de vidrio largos, al final de los cuales se les adapta un refrigerante para evitar la pérdida de disolvente. Comúnmente, los sistemas abiertos no cuentan con dispositivos para monitorear presión y/o temperatura.

La principal ventaja de la extracción asistida con microondas es la rapidez (10 – 30 min), esto se debe a que las microondas proveen la suficiente energía para extraer los

analitos ligados con la matriz sólida hacia el disolvente extractante, debido a dos factores: (1) las microondas interactúan directamente con el analito facilitando la remoción de los mismos y (2) las temperaturas alcanzadas son mucho más altas que las logradas en la extracción soxhlet convencional³². Otras ventajas de esta técnica son que se utilizan volúmenes moderados de disolvente (10 – 70 mL); se pueden llevar a cabo extracciones múltiples (hasta 12 extracciones simultáneas en el sistema de extracción presurizado); se obtienen extracciones bastante reproducibles, sobre todo en el sistema presurizado ya que se puede controlar la temperatura o la presión durante la extracción. Entre las principales desventajas se encuentran: se requiere que el disolvente absorba las microondas (a menos que en la matriz haya presencia de agua); se requiere de una etapa de limpieza para separar el disolvente conteniendo los analitos de la matriz; se puede requerir de una etapa de preconcentración para el caso de baja concentración de los analitos y/o baja sensibilidad del instrumento de medición; para el caso del sistema presurizado se requiere de esperar un tiempo para que se enfríen los vasos de extracción, además de que se deben respetar las medidas de seguridad ya que puede haber problemas de explosión por las altas presiones generadas en los vasos de extracción.

1.3.4 EXTRACCIÓN CON FLUIDOS PRESURIZADOS.

La última de las técnicas instrumentales de extracción es la extracción con fluidos presurizados (PFE, por sus siglas en inglés: Pressurised Fluid Extraction) a esta técnica también se le conoce como PLE (Pressurised Liquid Extraction) y comercialmente como ASE (Accelerated Solvent Extraction). Esta técnica apareció comercialmente en 1995 y utiliza disolventes orgánicos con la aplicación de calor y alta presión para extraer analitos orgánicos. En contraste con las otras dos técnicas descritas, la ASE es una técnica automatizada capaz de extraer hasta 24 muestras secuencialmente. El tiempo normal de esta técnica es de 12 minutos por muestra. En la Figura 5 se muestra un diagrama esquemático de un sistema de extracción con fluidos presurizados.

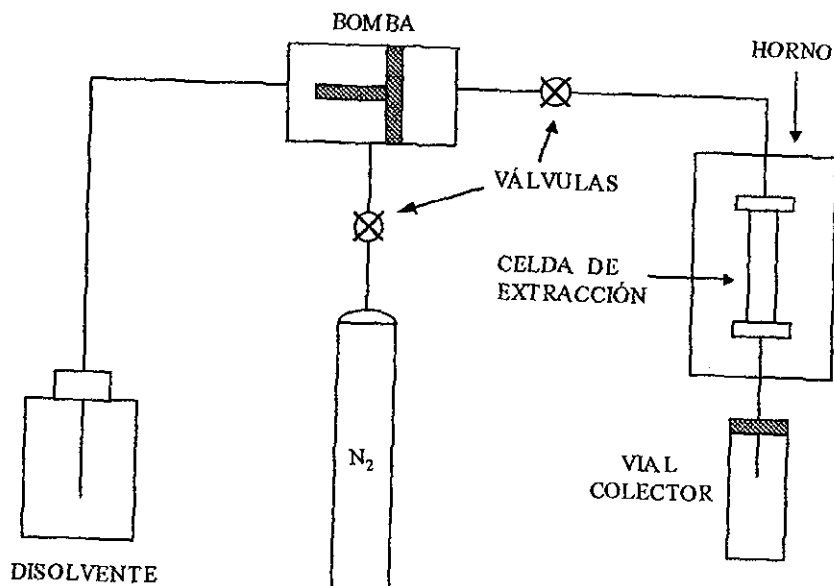


Figura 5. Diagrama esquemático de un sistema PFE

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El equipo de PFE está construido casi en su totalidad de acero para resistir las altas presiones (500 – 300 psi). El procedimiento de operación es como sigue^{37, 39, 40}: (a) colocar la muestra dentro de la celda de extracción; (b) llenar la celda con disolvente extractante; (c) calentar y presurizar la celda a los valores preestablecidos en el controlador; (d) extraer la muestra por un cierto tiempo (extracción estática); (e) transferir el disolvente al vial colector y limpiar la muestra con disolvente fresco; (f) purgar el disolvente residual de la muestra hacia el vial colector con ayuda de un gas inerte (generalmente se usa N₂).

Entre las ventajas de esta técnica se puede decir que es una técnica de extracción rápida (10 – 20 min); volúmenes moderados de disolvente (15 – 60 mL); no se requiere etapa de filtración; se pueden alcanzar temperaturas y presiones elevadas las cuales facilitan la extracción de los analitos; el sistema puede ser automatizado fácilmente^{35, 40, 41}. De las desventajas se puede mencionar el alto costo del equipo y que las temperaturas elevadas (mayores a 200°C) pueden degradar los analitos termolábiles; otra desventaja es que los extractos necesitan una etapa de limpieza, esto último es inevitable para cualquier técnica de extracción que use disolventes como medio de extracción^{35, 40, 41}.

1.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN PARA PAH's ASISTIDOS CON MICROONDAS.

Los métodos de digestión con ácidos de muestras sólidas para la determinación de metales fueron los primeros en los que se aplicaron las microondas para acelerar el proceso de digestión. Los procesos de digestión asistidos con microondas surgieron a principios de los 70's³⁸, mucho antes que los métodos de extracción se beneficiaran de las microondas, y cuyo primer caso se dio en los años 80's⁴⁵. Las digestiones asistidas con microondas, en su mayor parte se hacen en vasos o por lote en hornos de microondas a elevadas presiones y temperaturas; sin embargo, los casos más interesantes son aquellos que utilizan hornos de microondas focalizados, en los cuales se diseñan métodos de digestión en línea y/o completamente automatizados^{38, 42 - 44}. Una aplicación interesante es la propuesta por P. Torres y su grupo de trabajo⁴⁴ quienes diseñaron un método completamente automatizado para la determinación de metales (Fe, Cu y Zn) en muestras sólidas con ayuda de una estación robótica. En este método se sustituye a la digestión en parrilla por la digestión asistida por microondas, acortando el tiempo de 2 hrs. a 3 minutos. Después de la digestión, la disolución resultante se transporta a un espectrofotómetro de absorción atómica obteniéndose resultados bastante reproducibles (RSD < 2%).

Ganzler et al⁴⁵ fueron los que propusieron por primera vez la extracción asistida con microondas como un nuevo método de preparación de muestras para la determinación cromatográfica de productos naturales y pesticidas en alimentos y sólidos, obteniendo recuperaciones cuantitativas de bromofos y paration, fortificadas en matrices sólidas, con tiempo de irradiación menor de 1 minuto a 1140 Watts, utilizando 0.5 – 1 gr. de muestra y 2 – 3 mL de etanol.

En la Tabla 2 se mencionan algunos de los métodos más representativos asistidos con microondas desarrollados para extraer PAH's de matrices sólidas en los últimos 8 años.

Tabla 2. Métodos para extraer PAH's de matrices sólidas con horno de microondas^a.

MATRIZ	DISOLVENTE	CONDICIONES DE EXTRACCIÓN	COMPOSICIÓN	REFERENCIA
Sedimentos de referencia	metanol (80 mL)	sistema presurizado 1 gr. de muestra, 40 min., 140° C HPLC-fluorescencia	28 mg/Kg	46
Arcillas fortificadas	cloruro de metileno (150 mL)	sistema atmosférico 7 grs. de muestra 50-60 min, POT: 50% GC-MS	***	32
Plantas	hexano:acetona(3:2) (50 mL)	sistema presurizado 5 gr. de muestra 20 min., 140° C HPLC-fluorescencia	5 µg/Kg	47
Sedimentos marinos	hexano:acetona(1:1) hexano(10% agua) tolueno(10% agua) (30 mL)	sistema presurizado 2 gr. de muestra 6 min., POT.: 660 W GC-FID	50 - 600 µg/Kg	48
Suelos	cloruro de metileno (70 mL)	sistema presurizado y atmosférico 2 gr. de muestra 20 min., POT.: 297 W GC-FID	100 – 170 mg/Kg	49
Suelos	cloruro de metileno cloruro de metileno + acetona + agua (40 mL)	sistema atmosférico 5 gr. de muestra 10 min., POT.: 30 W GC-MS	0.5 – 12 mg/Kg	50

*** No se informa la composición.

^a El sistema atmosférico trabaja con vasos abiertos mientras que el sistema presurizado trabaja con vasos herméticamente cerrados. Además de las condiciones de extracción, se dan en esta misma tabla los métodos de cuantificación: HPLC = cromatografía de líquidos de alta eficiencia; GC = cromatografía de gases; FID = detector de ionización de flama; MS = espectrometría de masas; UV = detector de ultravioleta.

Tabla 2. Continuación.

MATRIZ	DISOLVENTE	CONDICIONES DE EXTRACCIÓN	COMPOSICIÓN	REFERENCIA
Sedimentos marinos	hexano:acetona (1:1) (30 mL)	sistema presurizado 5 grs. de muestra 5 min., 115° C HPLC-UV, fluorescencia	200 µg/Kg	51
Suelos	hexano:acetona (1:1) (40 mL)	sistema presurizado 2 grs. de muestra 20 min., 120° C POT.: 50 % CG-MS	43 – 57 mg/Kg	52
Suelos Suelos fortificados	hexano:acetona (1:1) (30 mL)	sistema presurizado 5 grs. de muestra 10 min., 115° C POT.: 100 % CG-MS	5 – 100 mg/Kg	53
Sedimentos marinos de referencia	hexano:acetona (1:1) (30 mL)	Sistema presurizado 5 grs. de muestra 5 min., 115° C GC-MS	475 – 961 mg/Kg	54
Sedimentos marinos y de río (materiales de referencia)	cloruro de metileno (30 mL) (30% de agua en la muestra)	Sistema atmosférico 0.1 – 1 gr. de muestra 10 min. POT.: 30 W GC-MS	1000 µg/Kg	55

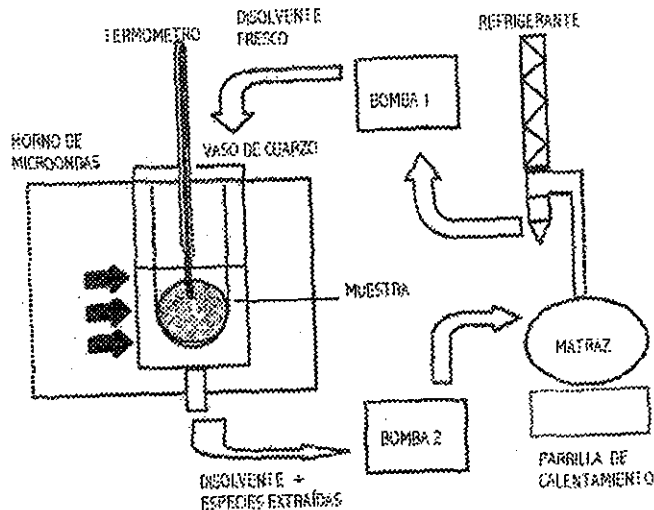
Idealmente, cualquier técnica de extracción líquido/sólido debiera cumplir con las siguientes condiciones: un periodo corto de extracción, utilización de disolventes no tóxicos, cantidad mínima utilizada del disolvente extractante, eliminación de la etapa de evaporación del disolvente y manipulación mínima de la muestra y extracto por parte del analista; es decir la automatización de la técnica.

La técnica convencional (extracción soxhlet) para extraer compuestos orgánicos de matrices sólidas utilizó por mucho tiempo grandes cantidades de disolventes aromáticos (benceno y tolueno) y clorados (cloruro de metileno y cloroformo). En las últimas mejoras a la técnica soxhlet convencional, lo único que se ha logrado cambiar es la utilización de hexano y acetona como disolventes extractantes; sin embargo, no se han podido disminuir el tiempo de extracción ni la cantidad de disolventes, y tampoco el hexano y acetona se utilizan para todos los tipos de muestras y compuestos. Las nuevas técnicas de extracción como: extracción con microondas, extracción con fluidos supercríticos, extracción con disolventes a presiones elevadas y extracción ultrasónica han tratado de acercarse a las condiciones ideales dadas anteriormente. En general, las nuevas técnicas han mejorado alguna o algunas de las condiciones que las hacen viables como alternativas a la técnica de extracción convencional. En lo que respecta a la técnica de extracción con horno de microondas, se ha logrado disminuir la cantidad de disolvente a 40 mL en promedio, y la utilización de disolventes menos tóxicos se ha incrementado notablemente en años recientes como puede verse en la Tabla 2, aunque para esta técnica todavía se requiere de una etapa de evaporación del disolvente. Sin duda, la mayor ventaja con respecto a la extracción soxhlet convencional, es la reducción del periodo de extracción, con un periodo de 20 minutos en promedio. Por otra parte, esta técnica no es tan fácil de automatizar o de hacer la extracción en línea, aunque se pueden encontrar detalles interesantes en la literatura para lograrlo, de los cuales se hablará en la siguiente sección.

A continuación se mencionan algunos ejemplos de métodos asistidos con microondas que constatan las ventajas con respecto a la extracción soxhlet convencional.

L. E. García-Ayuso et al³² diseñaron un método soxhlet asistido con microondas para determinar PAH's, y cuyo esquema se muestra en la Figura 6. En éste, la muestra fortificada (7 grs. en un cartucho de celulosa) se coloca en un reactor (vaso de cuarzo) el cual se encuentra en la cavidad de un horno de microondas focalizado. El reactor con la muestra y el matraz se llenan con 30 y 120 mL de cloruro de metileno, respectivamente. El proceso de extracción consiste en un número determinado de ciclos. Cada ciclo se lleva a cabo en tres pasos: (1) llenado del vaso de extracción por medio de la Bomba 1; (2)

irradiación por 15 seg. a 50% de potencia; (3) vaciado del vaso de extracción por medio de la Bomba 2 hacia el matraz de destilación. La duración de un ciclo es de 6 minutos.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 6. Esquema del sistema de extracción soxhlet asistido con microondas.

El sistema de extracción propuesto por García-Ayuso tiene las siguientes ventajas comparadas con el sistema de extracción soxhlet: reducción del tiempo de extracción (de 8 hrs. a 50 – 60 min.); eficiencia similar o aun más alta que la técnica convencional. Esto se puede deber a las mayores temperaturas alcanzadas y a la interacción de las microondas con los analitos; desde luego también tiene que ver que la muestra está en continuo contacto con el disolvente fresco. Una de las desventajas principales fue el aumento del volumen de disolvente extractante, de 70 a 150 mL comparado con la técnica convencional.

Otro método de extracción con horno de microondas pero a presiones y temperaturas elevadas (sistema presurizado), es el propuesto por K. K. Chee et al⁵¹. Este método se desarrolló para la extracción de PAH's en sedimentos marinos comparándose su eficiencia con el soxhlet convencional. En este método, las muestras (5 grs.) se colocan en vasos de teflón, se les adicionan 30 mL de una mezcla hexano:acetona(1:1) como agente extractante y se calientan a 115° C durante 5 minutos. Con este método se alcanzan las siguientes ventajas comparadas con el soxhlet bajo eficiencias similares de extracción: (a)

disminución del volumen del disolvente extractante, de 300 a 30 mL; (b) disminución del periodo de extracción de 16 hrs. a 5 minutos.

Un método más reciente es el propuesto por H. Budzinski et al⁵⁵, quienes extraen PAH's de sedimentos marinos y de río en un horno de microondas focalizado que trabaja a presión atmosférica, comparando los resultados con los obtenidos en el soxhlet convencional. En el método propuesto se extraen entre 0.1 y 1 gr. de muestra con 30 mL de cloruro de metileno a una potencia de 30 watts durante 10 minutos. Puesto que el disolvente utilizado no absorbe las microondas se adiciona agua a las muestras, encontrándose las mayores recuperaciones con un 30 % de agua en las muestras. Las recuperaciones obtenidas con este método son mayores al 85 % en comparación con el soxhlet y con porcentos de RSD muy similares (< 15 %). Algo que llama la atención en este método es que el periodo de extracción con el soxhlet es de 48 hrs., cuando la mayoría de los métodos encontrados (ver ejemplos anteriores) utilizan tiempos entre 6 a 15 hrs. Otra ventaja de este método es la reducción del volumen del disolvente de 125 mL a 30 mL en comparación con el método empleando el soxhlet.

Con estos tres ejemplos se ha tratado de dar un panorama de los métodos más representativos de extracción asistidos con microondas encontrados en la literatura. Cabe mencionar que aunque en la mayoría éstos se haya reducido el volumen del disolvente extractante en comparación con el soxhlet, esto no es suficiente para evitar una etapa de evaporación del disolvente. De hecho se pueden encontrar métodos en los cuales no es necesaria esta etapa, lo cual se debe más bien al nivel tan alto de PAH's contenidos en la muestra, cantidad suficiente para que los niveles en el disolvente extractante se encuentren dentro del intervalo lineal del instrumento de medición⁵². Sin duda, el factor más importante por el que se siguen desarrollando métodos de extracción asistidos con microondas, es la disminución significativa del periodo de extracción lo cual se refleja en el mayor número de muestras analizadas así como en la disminución del costo del análisis.

1.5 MÉTODOS EN LÍNEA PARA EXTRAER PAH's DE MATRICES SÓLIDAS.

Son pocos los trabajos que se han realizado para extraer PAH's en línea. Esto no se debe al desinterés de los investigadores, sino más bien a las dificultades técnicas para llevar a cabo la extracción. Como ejemplo de esta dificultad, se pueden encontrar trabajos de digestiones ácidas en línea sobre matrices sólidas para extraer trazas de metales^{38, 56, 57}. Revisando el proceso de digestión, (a) un cartucho con la muestra sólida se conecta en línea sobre un flujo de disolución ácida, (b) el cartucho y el disolvente se calientan por medio de una resistencia eléctrica o por microondas dentro de un horno, llevándose a cabo la digestión en línea, (c) después del cartucho de digestión se coloca un cartucho de adsorbente como puede ser una resina de intercambio iónico donde los cationes metálicos se adsorben y de esta forma se preconcentran los analitos, (d) se hace pasar una disolución con un agente complejante y/o diferente pH para desadsorber los analitos, (e) finalmente los analitos preconcentrados son llevados a la flama de un espectrofotómetro de absorción atómica o a un espectrofotómetro de emisión con plasma. El proceso, en general, se puede resumir en las siguientes etapas: **A-Digestión**, **B-Preconcentración** y **C-Medición**. Estas mismos etapas también se llevarían a cabo en la extracción líquido/sólido para extraer compuestos orgánicos, pero ahora cambiándole el nombre a la etapa **A** por el de *Extracción*. Sin embargo, en la extracción líquido/sólido, la etapa que presentaría problemas sería la de *Preconcentración* ya que se requeriría de un adsorbente no polar (fase C18 para el caso de los PAH's) para retener los analitos, los cuales son generalmente de tendencia no polar; no obstante, la retención sería difícil de llevarse a cabo ya que tanto el disolvente extractante como el adsorbente son no polares. La única manera de lograr la retención, sería utilizando agua como disolvente extractante, lo cual todavía esta en vías de investigación como se verá más adelante.

A la par del primer trabajo de extracción de PAH's con horno de microondas casero⁴⁵ ya se proponían métodos de extracción en línea con columnas de acero con sistemas parecidos al que se usa en HPLC. F. Mangani et al⁵⁸ propusieron un método donde

la muestra era colocada dentro de una columna de acero (4 mm de diámetro interno y 20 cm de longitud) haciendo pasar sobre la misma de 6 a 12 mL de tolueno con ayuda de una corriente de nitrógeno en la parte superior de la columna. Al mismo tiempo la columna era calentada con una manta de calentamiento entre 25 y 100° C. Una vez que se hacía pasar todo el disolvente, éste se recibía en un recipiente quedando listo el extracto para la cuantificación de los PAH's. El proceso de extracción se lleva a cabo en aproximadamente 1.5 hrs. contra 24 hrs. con soxhlet. Las recuperaciones logradas con este método son similares a las obtenidas con soxhlet. Nótese que en estos tiempos (1987) la utilización de disolventes como el tolueno, el cual es más tóxico que los disolventes utilizados (acetona y hexano) en tiempos más recientes era común, ver Tabla 2. Esta técnica evolucionó más adelante en lo que ahora se conoce como: extracción con disolventes presurizados (PLE, ver sección 1.3.3).

M. T. Tena et al⁵⁹ en 1996 propusieron un nuevo método para extraer PAH's utilizando extracción con fluidos supercríticos adaptado al sistema de medición en línea por medio de un sensor de fluorescencia con un cable de fibra óptica. En este sistema se medía la señal de fluorescencia a través del tiempo de los PAH's a la salida de la celda y se integraba el área bajo la curva, la cual era directamente proporcional a la cantidad de PAH's en la muestra. Este método es en sí cualitativo, ya que no nos dice las cantidades de cada uno de los PAH's encontrados en la muestra.

En 1998, L. E. García-Ayuso et al³² proponen un método de extracción soxhlet con horno de microondas focalizado como medio de calentamiento, también hacen uso de bombas peristálticas para controlar el reflujo y el llenado del matraz que contiene el cartucho de extracción con la muestra. Los tiempos de extracción son del orden de 1 hr., en contraste con las 8 hrs. del soxhlet convencional. Sin embargo, debido a las grandes cantidades del disolvente utilizado (150 mL), se requiere de una etapa de preconcentración antes de introducir los extractos al sistema de medición.

El más reciente sistema de extracción en línea apareció en el 2000 y fue desarrollado por M. Ericsson et al⁴⁶ quienes propusieron un método de extracción muy

similar al método de extracción ya mencionado por M. T. Tena⁵⁹. En este método, una celda cerrada construida con teflón se conecta a la entrada y a la salida de una tubería también de teflón. La celda se encuentra dentro de la cavidad del horno de microondas donde recibe una irradiación continua de ondas de microondas las cuales interactúan con el disolvente (metanol) el cual pasa continuamente a través de la celda. A la salida de la celda está conectado un detector de fluorescencia el cual monitorea la señal de los PAH's, obteniéndose el perfil de una curva. Este perfil es indicativo de la presencia de PAH's. El proceso de extracción se lleva a cabo en aproximadamente 40 minutos con un gasto de disolvente de 80 mL. Este método es totalmente cualitativo y sirve para decidir si el extracto se someterá o no al proceso completo de medición; es decir, colección del extracto, preconcentración e introducción al cromatógrafo de gases para la cuantificación de los PAH's individuales.

Los métodos de extracción en línea, tienen el inconveniente de que requieren de una etapa de evaporación del disolvente para posteriormente hacer la cuantificación. De aquí la tendencia de los nuevos métodos de extracción sea disminuir la cantidad de disolvente o utilizar agua como disolvente extractante acoplado a un método de extracción en fase sólida, evitando así la etapa de evaporación del disolvente.

Uno de los principales problemas que se presentan al desarrollar un método de extracción en línea es el acoplamiento de la celda de extracción, la cual está presurizada, con el sistema de introducción del disolvente extractante y el sistema de medición que están a presión atmosférica. Este problema se ha logrado superar colocando restrictores en la entrada y salida de la celda, los restrictores se utilizan en la técnica de extracción con fluidos supercríticos. El uso de restrictores para extracciones en línea ya se mencionó en el método propuesto por M. Ericsson et al⁴⁶.

1.6 MÉTODOS DE FORTIFICACIÓN PARA PAH's.

Los trabajos encontrados en la literatura sobre extracción de PAH's de muestras sólidas se aplican sobre diferentes tipos de matrices sólidas: plantas, cenizas, suelos y sedimentos marinos (ver Tabla 2). Así también, los métodos se aplican a muestras reales y/o sintéticas, estas últimas son muestras fortificadas con los PAH's de estudio. No hay un método estándar que sigan los investigadores para preparar las muestras fortificadas, más bien cada investigador sigue su propio método de fortificación. En la literatura se encontraron métodos tan diferentes de fortificación, como el propuesto por M. T. Tena et al⁵⁹, quienes le adicionan a 5 grs. de tierras diatomáceas de 25 a 600 microlitros de una disolución con los PAH's, dejando posteriormente evaporar el disolvente entre media y una hora, quedando así la muestra sintética para hacerle la extracción. Por otra parte, el método más laborioso es el utilizado por L. E. García-Ayuso et al³², quienes mantienen en contacto durante un periodo de siete días 500 grs. de sólido. con 200 mL de una disolución con los PAH's, después de lo cual evaporan el disolvente En la Tabla 3 se dan algunos de los métodos de fortificación encontrados en la literatura en diferentes matrices.

Tabla 3. Métodos de fortificación.

MATRIZ	FORTIFICACIÓN	COMPOSICIÓN	REFERENCIA
Tierras diatomáceas	5 grs. de sólido + 25-600 μ L disolución con PAH's en hoja de papel aluminio. Se deja de 30 a 60 min. para que se evapore el disolvente (acetonitrilo).	62 – 123 mg/Kg	59
Arcillas	500 grs. de sólido + 200 mL de disolución con PAH's en un matraz de bola. Se deja reposar la mezcla por 7 días y posteriormente se evaporó el disolvente (etil éter) en rotavapor.	***	32
Suelo	5 grs de sólido + 50 – 250 μ L de disolución con PAH's en una hoja de aluminio. Se deja reposar la muestra por 10 min. para que se evaporara el disolvente (cloruro de metileno).	5 – 100 μ g/Kg	53

*** No se informa la composición.

Tabla 3. Continuación.

MATRIZ	FORTIFICACIÓN	COMPOSICIÓN	REFERENCIA
Arena (1% de materia orgánica)	5 grs. de sólido + disolución con PAH's. Inmediatamente se verte el disolvente extractante para realizar la extracción.	475 – 961 mg/Kg	54
Cenizas	3 grs. de sólido + disolución con PAH's. Se evapora el disolvente (cloruro de metileno). Se verte más disolvente y se evapora inmediatamente.	30 µg/Kg	58

En los artículos de referencia de la Tabla 3 no se mencionan los motivos del por qué se usan estas matrices para fortificar, sino que depende de cada problema en particular. Por ejemplo, hay gran cantidad de artículos (ver Tabla 2) donde se hace la determinación de PAH's en sedimentos marinos, los cuales se componen de arenas (tierras diatomáceas), de ahí el interés de utilizarlas como matrices para la fortificación. Para el último método de la tabla anterior, se utilizan cenizas como soporte debido a que éstas se forman como subproducto en las plantas termoeléctricas, en donde se presupone quedan adsorbidos los PAH's formados durante la combustión. Desde luego que antes de utilizar las cenizas en la fortificación, éstas se someten a un proceso de lavado con 30 mL de tolueno a 100° C, antes de la adición de los PAH's.

1.7 POTENCIAL DEL AGUA COMO DISOLVENTE EXTRACTANTE DE COMPUESTOS ORGÁNICOS.

El pretratamiento de las muestras sólidas es uno de los principales problemas a resolver de los procesos analíticos, particularmente en lo que se refiere a las extracciones de compuestos orgánicos. Esto representa uno de los principales obstáculos para la automatización completa de los procesos analíticos, lo cual sólo se logra usando una estación robotizada.

La disolución total es obligatoria en algunos casos, pero el tratamiento ideal de las muestras sólidas es la obtención de una disolución parcial que permita obtener una fase líquida que contenga los analitos de interés y una fase sólida en la cual permanezcan todas o la mayoría de las interferencias. Este proceso se designa comúnmente como extracción líquido-sólido o "lixiviación".

En la búsqueda de alternativas de disolventes extractantes que sean menos tóxicos y faciliten el proceso de extracción M. D Luque de Castro y M. M. Jiménez-Carmona⁶⁰ hacen una revisión del potencial del agua como disolvente extractante de compuestos orgánicos y como agente lixivante de muestras sólidas en continuo. El principio por el cual se puede utilizar agua como disolvente extractante de compuestos orgánicos, se debe a la disminución del valor de la constante dieléctrica a temperaturas y presiones elevadas, y cuyas propiedades del agua bajo estas condiciones se asemejan a la de los disolventes orgánicos, sobre todo en lo que se refiere a la solubilidad en agua de los compuestos no polares y moderadamente polares, compuestos alifáticos y aromáticos, respectivamente.

Hay dos procesos en general de cómo se puede usar el agua como alternativa a los disolventes orgánicos: métodos de extracción continuos y métodos de extracción discontinuos. En las siguientes páginas se da una explicación de cada uno de ellos, así como ejemplos que los respalden.

1.7.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DISCONTINUOS.

1.7.1.1 EXTRACCIÓN DISCONTINUA CONVENCIONAL.

Esta ha sido la forma comúnmente usada desde hace mucho tiempo para remover una o algunas especies de la muestra sólida. Algunos ejemplos de esta aplicación se encuentran en el área ambiental para la remoción de nutrientes de sólidos⁶¹; en el área clínica en la remoción de fenilalanina de manchas de sangre⁶² y en el análisis de alimentos para determinación de ácido glutámico libre en sopas y productos cárnicos⁶³.

Las principales desventajas de la Extracción Discontinua Convencional son: el tiempo (debido a que se debe alcanzar el equilibrio entre la fase sólida y el agua) y la no-cuantitatividad (porque se debe alcanzar el equilibrio de reparto entre las fases sólida y líquida). El desarrollo de métodos alternativos se ha enfocado a minimizar o evitar los aspectos negativos y a dotar al proceso de extracción con mejores características.

1.7.1.2 EXTRACCIÓN DISCONTINUA ASISTIDA CON FUENTES DE ENERGÍA.

Entre las fuentes más comunes de calentamiento se encuentran: ondas de ultrasonido, ondas de microondas y aplicación de presiones elevadas.

EXTRACCIÓN DISCONTINUA ASISTIDA CON ULTRASONIDO

Aunque la utilización de ondas de ultrasonido como fuente de energía ha mostrado poco interés por parte de los químicos analistas, su potencial en el proceso de extracción supera al de otras fuentes de energía. Usualmente, los efectos ultrasónicos son más intensos en sistemas químicos heterogéneos que en homogéneos, debido a que se favorece la emulsificación y se favorece la transferencia de masa entre las dos fases. Un problema de esta técnica, en la mayoría de los casos, es que las condiciones drásticas de trabajo (temperaturas y presiones extremas en la interfase líquido/sólido debido a la cavitación

acústica, da lugar a la formación de burbujas) creadas por las ondas de ultrasonido en sistemas líquido-sólido provoca la disolución total de los sólidos más que una lixiviación.

EXTRACCIÓN DISCONTINUA ASISTIDA CON MICROONDAS

La asistencia por microondas de lixivaciones discontinuas con agua es un campo prometedor, debido al carácter polar del agua que absorbe eficientemente las ondas de microondas. Un excelente ejemplo de esta aplicación es la dada por S. J. Stout y su grupo de trabajo⁶⁴ quienes pudieron determinar herbicidas de sólidos a niveles de ppb, utilizando 0.1 M de disolución de acetato de amonio:agua (5:95) o metanol:agua(1:1) como mezclas extractantes. El tiempo de preparación se reduce de 2 hrs. a 10 min.

EXTRACCIÓN DISCONTINUA ASISTIDA CON PRESIONES ELEVADAS

El desarrollo de métodos consistentes en hacer lixivaciones en vasos dentro de hornos de calentamiento, lo cual genera presiones y temperaturas elevadas, constituye otra alternativa para acelerar la etapa de extracción. El acoplamiento de extracción estática utilizando agua subcrítica con microextracción en fase sólida conduce a las siguientes ventajas: miniaturización, eliminación de disolventes orgánicos y disminución de costo y tiempo. Este método conduce a la determinación cuantitativa de PAH's de sólidos y partículas encontrados en el aire, además de la determinación de compuestos más volátiles (por ejemplo, alquilbencenos) y más polares (por ejemplo, aminas aromáticas) de sólidos contaminados⁶⁴.

1.7.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DISCONTINUOS-CONTINUOS.

El sistema soxhlet convencional entra dentro de esta clasificación. El método soxhlet es discontinuo, porque el disolvente lixivante actúa por etapas, por otro lado, el sistema es continuo ya que el disolvente es recirculado a través de la muestra. La ventaja más importante del soxhlet contra los sistemas de lixivación discontinuos es que el sistema

soxhlet es cuantitativo. Sin embargo, el sistema soxhlet tiene serias desventajas, tales como la lentitud del proceso y la dificultad para poder automatizarlo.

Este método de extracción permite extracciones cuantitativas, debido al contacto continuo de la muestra con porciones del disolvente limpio; sin embargo, es difícil de automatizarlo completamente. Un ejemplo de este método de extracción lo da M. Bou-Raad⁶⁵, quien utiliza un extractor soxhlet, con agua como disolvente extractante para la extracción de metales en varios tipos de carbón; sin embargo, el proceso de extracción es demasiado lento y sólo 10 a 40 % de los analitos se extraen después de 48 hrs.

1.7.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN CONTINUOS.

Los procesos de lixiviación con agua, sin asistencia de fuentes de energía, es un proceso muy lento. Este tiene además la desventaja de diluir al analito por el continuo flujo del disolvente extractante a través de la muestra sólida, lo que la hace una técnica no viable para lixiviación. Varias alternativas han sido propuestas para resolver el problema de la dilución las cuales se describen a continuación.

1.7.3.1 LIXIVIACIÓN CONTINUA ASISTIDA CON ULTRASONIDO.

El uso de ultrasonido ha mostrado ser útil para acelerar las extracciones acuosas en continuo, acortando el tiempo de análisis y reduciendo la dilución del analito. Para esto se han realizado dos propuestas, dependiendo de la velocidad de extracción. Cuando la extracción es lo suficientemente rápida, la muestra (localizada en una pequeña cámara provista con filtros para prevenir que los sólidos sean arrastrados por el disolvente extractante) es sometida a ondas de ultrasonido. De esta manera, el analito extraído se mezcla con el flujo de un agente derivatizante, si es necesario, antes de la detección. Si en cambio, la cinética de extracción no es suficientemente rápida, se utiliza un circuito cerrado, en el cual se localiza la cámara de la muestra a través de la cual el disolvente

extractante se recircula mientras la cámara de la muestra se somete a las ondas de ultrasonido. Después de un tiempo preseleccionado para la completa desadsorción del analito, una válvula cambia el flujo del disolvente extractante hacia el detector o para mezclarlo con un agente derivatizante. No obstante, esta metodología ha sido aplicada solamente para extraer boro de sólidos⁶⁶, y hierro de plantas⁶⁷. En ambos casos, el tiempo de lixiviación fue drásticamente acortado, de 2 - 3 hrs. a 3 - 5 minutos.

1.7.3.2 LIXIVIACIÓN CONTINUA ASISTIDA CON PRESIÓN Y TEMPERATURA ELEVADAS.

El uso de agua líquida a temperatura y presión elevadas provee una prometedora alternativa para los pretratamientos de muestra, debido a que el agua es el disolvente ideal para el desarrollo de metodologías limpias.

Dos estados de agregación del agua han sido usados en el modo de extracción continua, nombrados estado subcrítico (a temperaturas de 100 – 374 °C y a suficiente presión para mantener el agua en estado líquido) y estado supercrítico (temperaturas arriba de 374 °C y presiones superiores a los 220 bars). Cada estado tiene sus ventajas y desventajas. Las características comunes a ambos estados son: (1) el amplio intervalo dentro del cual puede cambiarse la constante dieléctrica del agua, y (2) la corrosividad, la cual se incrementa con el aumento de presión y temperatura.

La característica más sobresaliente de ambos estados del agua es su capacidad como agente lixivante para cambiar el valor de la constante dieléctrica (ϵ). De hecho, la constante dieléctrica puede cambiarse dentro de un amplio intervalo por el cambio de temperatura bajo presiones moderadas, ya que esta depende principalmente de la temperatura y sólo ligeramente de la presión. A temperatura y presión atmosférica el agua tiene una constante dieléctrica de 80, haciendo del agua un disolvente extremadamente polar. Este valor se puede bajar drásticamente elevando la temperatura bajo presiones moderadas. Por ejemplo, el agua subcrítica a 250 °C (y presión mayor a 40 atm., se

mantiene en estado líquido) tiene una $\epsilon = 27$, cuyo valor es similar a las constantes del etanol ($\epsilon = 24$) y metanol ($\epsilon = 33$), permitiendo así la extracción de compuestos de baja polaridad. El agua supercrítica (temperatura > 374 °C y presión > 221 bar) tiene una ϵ por debajo de 10 (similar al cloruro de metileno), haciendo al agua un disolvente extremadamente efectivo para compuestos no polares tales como alcanos. De esta manera, el agua puede usarse para extraer secuencialmente compuestos polares, moderadamente polares (PAH's) y no polares de matrices sólidas por el incremento secuencial de la temperatura de 50 a 400 °C ⁶⁸.

Una característica desfavorable del agua subcrítica y supercrítica es el aumento de su poder de corrosividad a temperaturas y presiones elevadas. Esto es un problema, sobre todo para el agua en estado supercrítico y además tiene restricciones severas para uso analítico debido a la ausencia de aparatos comerciales construidos con materiales suficientemente inertes. La reactividad química del agua supercrítica favorece grandemente las reacciones químicas con los analitos, lo cual se considera como una desventaja o limitación importante, dependiendo del objetivo del análisis.

Capítulo 2

METODOLOGÍA

2.1 EQUIPO, INSTRUMENTOS Y ACCESORIOS.

2.1.1 EQUIPO

Horno de microondas MAXIDIGEST MX 350, PROLABO.

Vortex MAXI MIX II, Thermolyne Type 37600 Mixer.

Balanza analítica Ohaus, precisión = 0.0001 grs.

Parrilla de calentamiento (*Estufafácil*).

Sistema de evaporación Kuderna-Danish.

Agitador magnético *TACUSSEL electronique*.

2.1.2 INSTRUMENTOS

Espectrofotómetro UV-Vis, *Varian Cary 3*.

2.1.3 ACCESORIOS

Celda de flujo de extracción, construida con teflón.

Accesorios de vidrio para Soxhlet.

Tubo de vidrio y refrigerante para el horno de microondas.

Esferas de vidrio (4 mm de diámetro).

2.1.4 REACTIVOS

Fluoreno, Aldrich, 98% de pureza.

Pireno, Aldrich, 99 % de pureza.

Fenantreno, Aldrich, 98 % de pureza.

Fluoranteno, Aldrich, 98.5 % de pureza.

Hexano, Mallinckrodt, grado HPLC.

Etanol anhidro, J. T. Baker, 99.9% de pureza.

Acetona, J. T. Baker

Agua destilada

Tierras diatomáceas, Aldrich, Chromosorb G, acid wash, malla 60/80.

2.2 DESCRIPCIÓN DE LA CELDA DE EXTRACCIÓN.

La celda de extracción fue diseñada en nuestro laboratorio y se mandó fabricar a OSYMA S. A. La celda se compone de dos piezas principales construidas con teflón; cuerpo y tapa, como se muestra en la Figura 7.

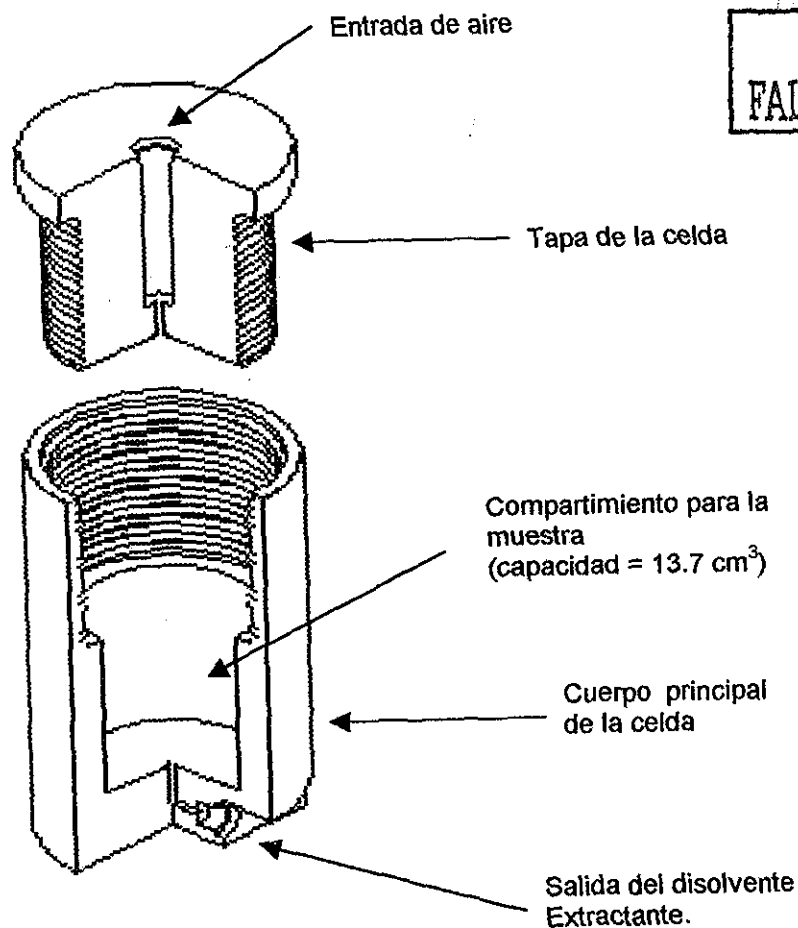


Figura 7. Celda de flujo de extracción para el horno de microondas.

Las ventajas de este tipo de celda se describen a continuación.

- 1) La celda es de forma cilíndrica con un diámetro externo de 5 cm y una altura de 10 cm. La razón de que la celda, así como la cavidad de la misma sean cilíndricas es para evitar problemas de irreproducibilidad en la irradiación de las microondas debido a la posición a como esté colocada la celda.
- 2) Conexiones de entrada y salida del disolvente con tubería de teflón de 0.5 ó 0.8 mm de diámetro interno. Estas conexiones permiten trabajar la extracción en línea evitando así pérdidas de disolvente.

2.3 MÉTODOS DE FORTIFICACIÓN.

Los Métodos 1 a 5 se utilizarán para preparar muestras fortificadas de las cuales se tomarán submuestras para hacerles la extracción.

MÉTODO 1. FORTIFICACIÓN EN ROTAVAPOR

- 1.- Se pesaron 15 grs. de tierras diatomáceas y se pusieron en un matraz de bola de 250 ml.
- 2.- Se vertieron 1.5 mL de una disolución de fluoreno 1000 ppm en etanol y 80 mL de etanol.
- 3.- Se conectó el matraz al rotavapor y se puso a mezclar durante 20.5 hrs., con un tiempo adicional de 15 minutos para evaporar todo el disolvente.
- 4.- Las tierras se pusieron en una caja de petri, extendiéndolas homogéneamente.

MÉTODO 2. FORTIFICACIÓN EN ROTAVAPOR (Variante del Método 1)

- 1.- Se pesaron 5 grs. de tierras diatomáceas y se pusieron en un matraz de bola de 250 ml.
- 2.- Se vertieron 25 mL de una disolución de fluoreno de 40 ppm en hexano.
- 3.- Se montó el matraz al rotavapor y se mezcló durante 2.75 hrs. hasta sequedad.
- 4.- Las tierras se pusieron en una caja de petri, extendiéndolas de forma homogénea.

MÉTODO 3. FORTIFICACIÓN EN REPOSO

- 1.- Se pesaron 5 grs. de tierras diatomáceas y se extendieron en una caja de petri.
- 2.- Se vertieron 25 mL de una disolución de fluoreno de 40 ppm en hexano.
- 3.- La caja se tapó con papel filtro y se dejó toda la noche en reposo sobre la mesa permitiendo la evaporación del disolvente.

MÉTODO 4. FORTIFICACIÓN CON AGITACIÓN MANUAL

- 1.- Se pesaron 5 grs. de tierras diatomáceas y se extendieron en una caja de petri.
- 2.- Se vertieron 25 mL de una disolución de fluoreno de 40 ppm en hexano.
- 3.- Se agitó la mezcla con una espátula, formando un ocho al agitar, hasta la evaporación del disolvente.

MÉTODO 5. FORTIFICACIÓN EN ROTAVAPOR (Variante del Método 2)

- 1.- Se pesaron 7 grs. de tierras diatomáceas y se pusieron en un matraz de bola de 250 ml.
- 2.- Se vertieron 25 mL de una disolución de fluoreno de 40 ppm en hexano.
- 3.- Se montó el matraz al rotavapor y se puso a mezclar durante 2 hrs. hasta sequedad.
- 4.- Se mezclaron las tierras en seco por 15 minutos más.
- 5.- La muestra fortificada permaneció en el matraz y se tapó con papel aluminio hasta su utilización.

Con el Método 6 se prepararán muestras fortificadas a las cuales se le hará la extracción a toda la muestra.

MÉTODO 6. FORTIFICACIÓN EN REPOSO (Variante del Método 3)

- 1.- Se pesó 1 gr. de tierras diatomáceas en un vaso de precipitado de 50 mL y se extendieron en el fondo del mismo.
- 2.- Se vertieron 3 mL de una disolución de hexano con el PAH de concentración 20 ppm para muestras fortificadas a 60 mg/Kg de tierras, y 40 ppm para muestras fortificadas a 120 mg/Kg de tierras.
- 3.- Se tapó el vaso con papel filtro y se dejó en reposo toda la noche para que se evaporará el disolvente.

2.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.

En los resultados se indicará el método de extracción que se utilizó por las abreviaturas que se indican entre paréntesis. Así también en los resultados, se mencionará el método de fortificación para preparar la muestra.

MÉTODO 1. EXTRACCIÓN CON AGITACIÓN MAGNÉTICA (AM).

- 1.- Se pesó 1 gr. de la muestra fortificada en un vaso de precipitados y se puso una barra magnética en el vaso.
- 2.- Se vertieron 10 ml de hexano y se agitó el vaso en un agitador magnético durante 20 minutos.
- 3.- Se filtro el extracto en un matraz Kitazato y se enjuagó con porciones de hexano.
- 4.- El disolvente extractante se trasvasó a un matraz volumétrico de 25 mL.

MÉTODO 2. EXTRACCIÓN CON VORTEX (V).

- 1.- Se pesó 1 gr. de muestra fortificada y se puso en un tubo de ensaye.
- 2.- Se vertieron 10 mL de hexano y se agitó el tubo con un *Vortex* durante 20 minutos.
- 3.- Se decantó el extracto en un matraz Kitazato y se enjuago con porciones de hexano.
- 4.- El disolvente extractante se trasvasó a un matraz volumétrico de 25 mL.

MÉTODO 3. EXTRACCIÓN CON HORNO DE MICROONDAS-TUBO DE VIDRIO (TV).

- 1.- Se pesó 1 gr. de muestra fortificada (preparada con el MÉTODO 5) y se puso en el tubo de vidrio del horno de microondas.
- 2.- Se vertieron 25 mL de disolvente o mezcla extractante.
- 3.- El tubo se colocó dentro del horno y se montó el refrigerante en la parte superior del tubo.
- 4.- Se calentó el sistema a presión atmosférica por un periodo de 15 minutos a una potencia de 30%.
- 5 - Se evaporó el disolvente con una corriente de nitrógeno y el residuo se redisolvió y aforó a 25 mL con hexano.

MÉTODO 4. EXTRACCIÓN CON HORNO DE MICROONDAS-CELDA DE EXTRACCIÓN (CE).

- 1.- Se puso un cartucho de papel filtro dentro de la celda de extracción.
- 2.- Se pesó 1 gr. de muestra fortificada y se extendió homogéneamente en el fondo del cartucho de extracción.
- 3.- Se pusieron 100 esferas de vidrio dentro de la celda (4 mm de diámetro).
- 4.- Se vertieron 8 mL del disolvente extractante y se tapó la celda.
- 5.- Se colocó la celda dentro del horno y se calentó durante 1 minuto a 20% de potencia.
- 6.- Se vació el disolvente hacia un matraz volumétrico de 10 mL el cual se encontraba sumergido en agua para enfriar el extracto.
- 7.- Se repitieron los pasos 4 a 6, dos veces más, para hacer reextracciones.

Nota 1: Para el caso de las muestras extraídas con agua se cambio el paso 6 por el descrito a continuación. Lo anterior, para mantener siempre al fluoreno soluble en agua.

6.- Se vació el disolvente hacia un matraz volumétrico de 10 mL, sumergido en agua para enfriar el extracto, al cual se le vertió previamente 1 mL de etanol.

Nota 2: El uso de las esferas de vidrio es para que no quedará un espacio de aire dentro de la celda.

MÉTODO 5. EXTRACCIÓN MANUAL (M).

- 1.- Se vertieron dos porciones de 1.2 mL de hexano en el vaso con la muestra fortificada.
- 2.- Se agitó la muestra y el disolvente manualmente.
- 3.- El extracto se decantó y se vertió a un matraz volumétrico de 10 mL.
- 4.- Se vertieron porciones de 1.2 mL de hexano en el vaso y se repitieron los pasos 2 y 3 hasta aforar el matraz de 10 mL.

MÉTODO DE EXTRACCIÓN SOXHLET

- 1.- Se colocó la muestra fortificada dentro de un cartucho de celulosa cuidando de que éste quedará cerrado para evitar que la muestra se saliera y se colocó el mismo dentro del sistema de extracción.

- 2.- Se vertieron 120 mL de hexano en un matraz de bola de fondo plano y se pusieron tres perlas de ebullición, después se adaptó éste al soxhlet.
- 3.- Se colocó el sistema soxhlet sobre una parrilla de calentamiento y se ajustó el controlador en la posición número 3 donde los reflujos se mantuvieron entre 6 y 8 por minuto.
- 4.- Se calentó por 6 hrs el sistema soxhlet.
- 5.- Se desmontó el soxhlet y se dejó enfriar a la temperatura ambiente.
- 6.- Se trasvasó el disolvente extractante del matraz a un sistema Kuderna-Danish para la evaporación de éste hasta un volumen final de 5 mL.
- 7.- El concentrado se trasvasó a un matraz volumétrico de 10 mL para su posterior cuantificación por espectrofotometría de ultravioleta.

2.5 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN.

Las cuantificaciones se realizaron por espectrofotometría de ultravioleta y el procedimiento se describe a continuación.

PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACIÓN

- 1.- Se aforó cada matraz con el disolvente extractante.
- 2.- Se preparó un estándar de fluoreno con el disolvente extractante.
- 3.- Se obtuvo el espectro de absorción, para el estándar y cada uno de los extractos, desde 200 hasta 400 nm y se tomaron tres lecturas independientes de absorbancia a una de las longitudes de onda máximas dependiendo del PAH a cuantificar.

La concentración a la que se preparó el estándar del PAH fue variable ya que la concentración dependió de la composición de fluoreno en la muestra fortificada; es decir, el estándar se preparó a la concentración esperada en la disolución final, suponiendo un 100 % de recuperación en las extracciones.

Los porcentajes de recuperación que se dan en las gráficas de este trabajo están dadas en base a la cantidad total de analito utilizado en la fortificación; por ejemplo, si para una muestra se obtiene 100 % de recuperación, esto indicaría que se ha extraído todo el analito adicionado en la muestra.

Capítulo 3

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 MÉTODOS DE FORTIFICACIÓN DE TIERRAS DIATOMÁCEAS.

La composición a la que fueron fortificadas las muestras normalmente osciló entre 60 y 200 mg de fluoreno por kilogramo de tierras diatomáceas. Este intervalo de concentraciones aparentemente es alto; sin embargo, buscando en la literatura se han encontrado niveles bajos de PAH's en muestras reales del orden de los 30 ppb⁵⁸ hasta niveles altos del orden de los 961 ppm⁵⁴. Con base en estos valores, se decidió trabajar en el intervalo ya mencionado debido a que las concentraciones de fluoreno obtenidas en las soluciones finales podían ser medidas de manera confiable por el método de cuantificación.

Se decidió probar inicialmente un método de fortificación largo (Método 1) con 20.5 hrs. de mezclado entre las tierras y la disolución conteniendo fluoreno. En la Gráfica 1 se observan las recuperaciones obtenidas de 5 submuestras utilizando el Método 1 de fortificación y el método de extracción con agitación magnética (AM). Las submuestras se tomaron de diferentes regiones en la caja de petri (regiones 1, 3, 5, 7 y 9 tal y como se muestra en la Figura 8) de manera que éstas fueran representativas del total de la muestra.

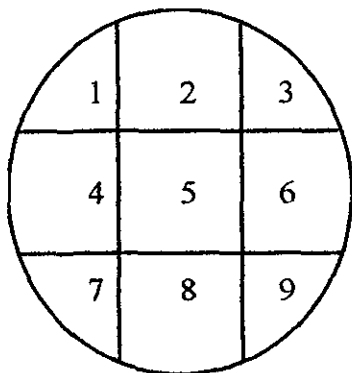
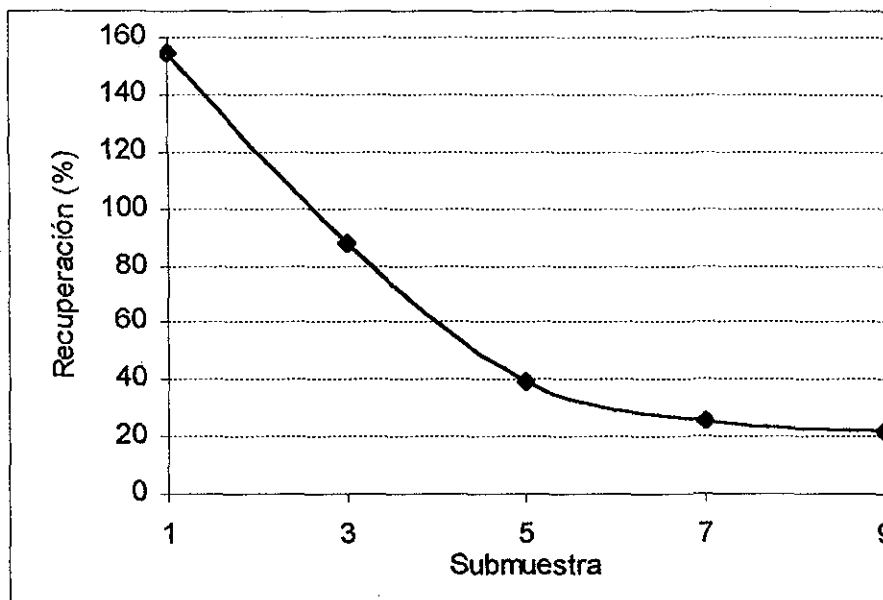


Figura 8. Regiones en la caja de petri de donde se tomaron las submuestras fortificadas (regiones 1, 3, 5, 7 y 9), siguiendo el Método 1 de fortificación.



Gráfica 1. Recuperaciones de 5 submuestras extraídas con agitación magnética durante 20 minutos utilizando 10 mL de hexano como disolvente extractante. La muestra se fortificó en rotavapor con el Método 1. La cantidad de fluoreno en la muestra fortificada fue de 100 mg / Kg de tierras.

Como se observa en la Gráfica 1, la fortificación no fue homogénea con el Método 1, de hecho se observa una tendencia a disminuir. Esta tendencia probablemente se debió a alguna pérdida del fluoreno durante el proceso de extracción ya que el orden como aparecen en la gráfica fue el orden cómo se llevaron a cabo las extracciones.

Debido a que el método anterior es demasiado largo y no se puede saber si con el mismo se obtienen submuestras homogéneas, se decidió probar con otros tres métodos diferentes de fortificación, donde no se necesitaran tiempos de fortificación largos pero que al mismo tiempo fueran lo más representativos posible de los métodos encontrados en la literatura (ver Tabla 3). En estos métodos se disminuyó la cantidad de muestra fortificada de manera que se pudieran extraer todas las submuestras, ya que con el método 1 se obtienen más submuestras, lo cual implicaba hacer más extracciones. Además, con los cambios de cantidad de muestra y volumen de la disolución de fluoreno, se trataron de mantener la relación disolvente/muestra y la composición de fluoreno en las muestras.

Las Gráficas 2, 3 y 4 muestran los resultados de las extracciones, utilizando el método de extracción con Vortex (Método 2, sección 2.4), de cuatro submuestras tomadas de cada una de las muestras preparadas con los métodos de fortificación 2, 3 y 4. Las submuestras se tomaron de acuerdo a como se muestra en la Figura 9. El hecho que se haya cambiado el método de extracción con agitación magnética por el método con Vortex se debió a que las tierras se fragmentaron por el contacto continuo de las mismas con la barra magnética.

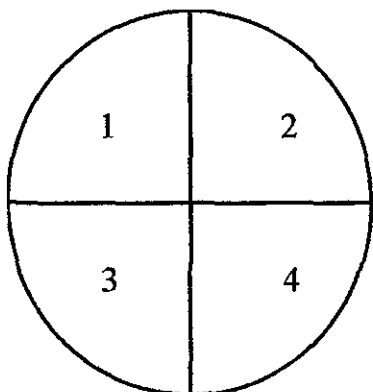
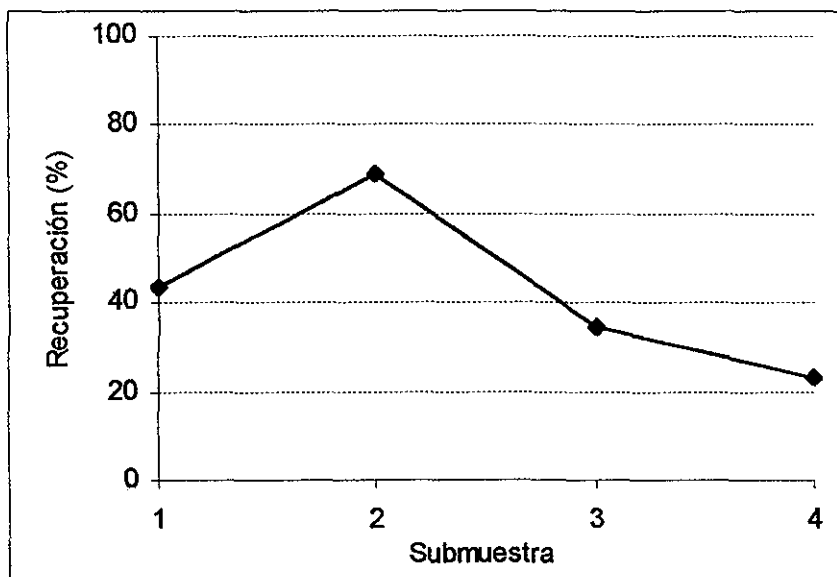
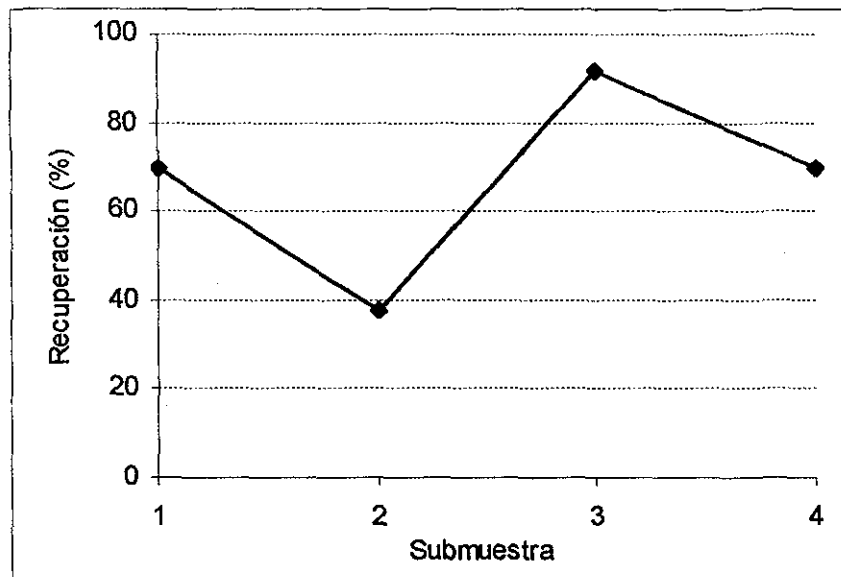


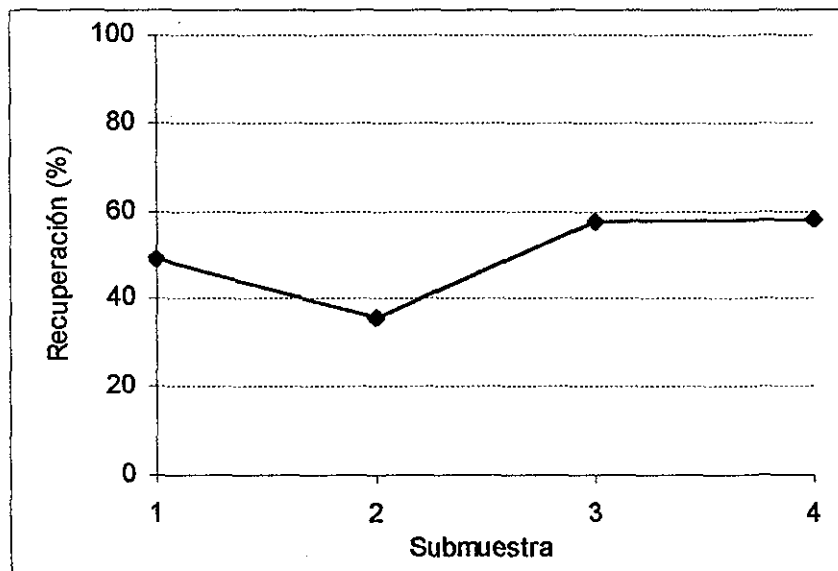
Figura 9. Regiones de la caja de petri de donde se tomaron las submuestras fortificadas por los Métodos 2, 3 y 4 de fortificación.



Gráfica 2. Recuperaciones de cuatro submuestras extraídas en un sistema Vortex durante 10 minutos con 10 mL de hexano. La muestra se fortificó, en rotavapor, con el Método 2. La cantidad de fluoreno en la muestra fortificada fue de 200 mg / Kg de tierras.



Gráfica 3. Recuperaciones de cuatro submuestras extraídas en un sistema Vortex durante 10 minutos con 10 mL de hexano. La muestra se fortificó, en reposo, con el Método 3. La cantidad de fluoreno en la muestra fortificada fue de 200 mg / Kg de tierras.



Gráfica 4. Recuperaciones de cuatro submuestras extraídas en un sistema Vortex durante 10 minutos con 10 mL de hexano. La muestra se fortificó, agitando manualmente, con el Método 4. La cantidad de fluoreno en la muestra fortificada fue de 200 mg / Kg de tierras.

De los resultados obtenidos con los Métodos 1 a 4 se concluye que con ninguno de ellos se logran obtener composiciones homogéneas, ya que la composición de fluoreno en cada submuestra no es la misma, existiendo una gran variabilidad en la composición. La Tabla 4 muestra el promedio, la desviación estándar y el porcentaje de RSD de las recuperaciones obtenidas por los Métodos 1, 2, 3 y 4.

Tabla 4. Parámetros estadísticos: Promedio, Desv. Est. y % RSD, obtenidos en los porcentajes de recuperación por los Métodos 1, 2, 3 y 4.

MÉTODO	PROMEDIO (%)	DESV. EST. (%)	% RSD
1	65.9	56.2	85.3
2	42.6	19.7	46.1
3	67.2	22.1	32.9
4	50.2	10.4	20.6

Una posible causa de que no se obtengan submuestras homogéneas, en cuanto a la composición del fluoreno, puede ser el hecho de que al irse evaporando el disolvente, el fluoreno se vaya acumulando en cantidades diferentes en cada región del total de las tierras. De hecho, de acuerdo a la literatura, en la mayoría de los casos se fortifica una determinada cantidad de sólido con un volumen pequeño del disolvente, el cual generalmente no empapa a todo el sólido. Con este método de fortificación, aparentemente, no se obtiene una composición homogénea en cada región de la muestra; sin embargo, este factor deja de ser trascendente ya que toda la muestra es sometida al proceso de extracción.

Una posible forma de lograr que la composición de la muestra fortificada sea homogénea es mezclando la muestra, el tiempo suficiente, una vez eliminado completamente el disolvente; es decir, en seco. Esto puede dar mayores posibilidades de obtener una muestra homogénea, siempre y cuando haya homogeneidad en el tamaño de la partícula del sólido. Es así que para extracciones posteriores se utilizó el Método 5, para fortificar las muestras, con la etapa de mezclado en seco incluida y el cual es una variante del Método 2. Se eligió modificar el Método 2 debido a que el uso del rotavapor permite al mismo tiempo evaporar el disolvente y realizar la etapa posterior de mezclado en seco.

3.2 CONDICIONES ÓPTIMAS DE EXTRACCIÓN.

Es importante remarcar que aunque el sistema de estudio de este trabajo es la extracción con horno de microondas utilizando la celda de flujo de extracción, la cual se muestra en la Figura 7, la optimización de cada uno de los parámetros se hizo en el tubo de vidrio del horno de microondas. La optimización de los parámetros no se llevó a cabo en la celda de extracción debido a que ésta es un sistema cerrado del cual no se conocen la temperatura y presión máximas puede resistir. Además, la optimización de los parámetros en el tubo de vidrio permitió tener una referencia de las condiciones iniciales para trabajar en la celda.

Los parámetros que se optimizaron en este estudio fueron los siguientes: disolvente extractante, potencia y tiempo de extracción. Se utilizó el método de extracción con horno de microondas y el tubo de vidrio (TV), el cual aparece como Método 3 en la sección 2.4.

3.2.1 DISOLVENTE EXTRACTANTE / MEZCLA DE DISOLVENTES EXTRACTANTES.

Entre los disolventes más utilizados para extraer PAH's, todavía se pueden encontrar disolventes aromáticos y clorados como tolueno y cloruro de metileno^{18, 32, 48 - 50}, respectivamente, pero únicamente como comparación con otros disolventes menos tóxicos. Por lo general no se utiliza un solo disolvente sino más bien una mezcla de disolventes como lo es la mezcla hexano:acetona (1:1), dando en general los mejores resultados de recuperación de PAH's de muestras sólidas. En este trabajo se estudiaron dos mezclas de disolventes con el fin de encontrar el más adecuado y capaz de absorber las ondas de microondas y que además extrajera la máxima cantidad de fluoreno de las tierras diatomáceas. Los resultados de los porcentajes de recuperación obtenidos con dos métodos diferentes de extracción se muestran en la Tabla 5. Se decidió utilizar la extracción por agitación con *Vortex* por dos razones: (1) para comparar las eficiencias de recuperación

entre los dos métodos con la mezcla hexano:acetona (1:1), y (2) conocer la eficiencia de extracción con hexano ya que este disolvente no absorbe la radiación de microondas. Para que se lleve a cabo la absorción de las microondas es necesario contar con la presencia de un disolvente polar.

Tabla 5. En esta tabla se muestran las recuperaciones obtenidas de extraer 1 gr. de muestra fortificada^a.

MÉTODO DE EXTRACCIÓN	DISOLVENTE EXTRACTANTE	VOLUMEN	TIEMPO	PORCIENTO DE RECUPERACIÓN
Horno de Microondas	hexano:acetona(1:1)	25 mL	15 min.	70.6
Horno de Microondas	hexano:etanol(4:1)	25 mL	15 min.	76.4
Vortex	hexano:acetona(1:1)	25 mL	15 min.	47.8
Vortex	hexano	25 mL	15 min.	56.5

^a Las extracciones se realizaron en horno de microondas y en Vortex. La potencia del horno se fijó en 30%. Las muestras se fortificaron a 140 mg/kg de tierras.

De la tabla anterior se observa que con las dos mezclas, hexano:acetona (1:1) y hexano:etanol (4:1), se obtienen recuperaciones comparables. Por otra parte, comparando los dos métodos de extracción, es evidente que las recuperaciones con el horno de microondas son mayores que las obtenidas con el sistema Vortex, 70% y 50% respectivamente. Esto último respalda el uso creciente del horno de microondas como técnica de extracción.

En extracciones posteriores se decidió utilizar la mezcla hexano:etanol (4:1) por dos razones: A-El etanol es menos tóxico que la acetona y B-La acetona absorbe en gran parte de la región UV, por lo que es necesario evaporarla completamente y redissolver al fluoreno en un disolvente que sea transparente a la radiación UV.

3.2.2 CONDICIONES ÓPTIMAS DE EXTRACCIÓN: POTENCIA, TIEMPO DE IRRADIACIÓN Y RELACIÓN DE DISOLVENTES.

Una vez elegida la mezcla hexano:etanol (4:1) como mezcla extractante, se realizó el estudio para establecer condiciones óptimas de tiempo, potencia y relación de disolventes.

Las Tabla 6, 7 y 8 muestran los resultados obtenidos en la potencia de irradiación, tiempo de irradiación y relación de disolventes extractantes, respectivamente.

Tabla 6. Recuperaciones obtenidas al variar la potencia del horno de microondas manteniendo los demás parámetros constantes^a.

POTENCIA (%)	VOL. DISOLVENTE	TIEMPO (min.)	% RECUPERACIÓN
10	25 mL	5	75.4
20	25 mL	5	84.2
30	25 mL	5	80.7
40	25 mL	5	79.3
50	25 mL	5	78.9
60	25 mL	5	77.6

^a volumen de mezcla extractante = 25 mL y tiempo de extracción = 5 min. %RSD = 3.7%. Las muestras se fortificaron a 140 mg/kg de tierras.

Para la optimización del tiempo de irradiación se fijará la potencia a un 20%, ya que con ésta se obtiene la mayor recuperación, y aunque no es significativamente diferente de las demás potencias, se pudo haber elegido cualquier otra potencia.

Tabla 7. Recuperaciones obtenidas al variar el tiempo de irradiación del horno de microondas^a.

TIEMPO (min.)	VOL. DISOLVENTE	POTENCIA (%)	% RECUPERACIÓN
5	25 mL	20	71.9
10	25 mL	20	71.9
15	25 mL	20	70.2
20	25 mL	20	69
25	25 mL	20	71.9
30	25 mL	20	70.2

^a Se mantuvieron constantes: volumen de disolvente extractante = 25 mL y potencia = 20%. %RSD = 1.7%. Las muestras se fortificaron a 140 mg/kg de tierras.

Tabla 8. Recuperaciones obtenidas al variar la relación de volúmenes de los disolventes extractantes^a.

Hexano:Etanol (mL)	POTENCIA (%)	TIEMPO (min.)	% RECUPERACIÓN
23:2	20	5	74.6
20:5	20	5	77
15:10	20	5	72

^a Se mantuvieron constantes: volumen de disolvente = 25 mL; potencia de irradiación = 20% y tiempo de irradiación = 5 min. %RSD = 3.4%. Las muestras se fortificaron a 140 mg/kg de tierras.

De los resultados obtenidos se encontró que no había diferencias en la recuperación al variar potencia de irradiación, tiempo de irradiación y proporción de disolventes; es decir, los parámetros estudiados no influyen en la recuperación del fluoreno. El criterio que se tomo para decidir que no había diferencias significativas en las recuperaciones fue la dispersión en los resultados de recuperación encontrados en la literatura para muestras fortificadas la cual varía entre 10 y 15 en porciento de RSD ^{32, 36, 53}, mientras que los porcentos de RSD de las tres tablas anteriores varía entre 1.7 y 3.7. El hecho de que no influyan los parámetros en las recuperaciones, indica que el fluoreno no se retiene fuertemente a las tierras diatomáceas ya que no se requiere mucha energía para extraerlo de las tierras. Resultados similares han sido observados por I. J. Barnabas et al⁵², quienes

encontraron que los parámetros como: temperatura, tiempo de extracción y volumen de disolvente, tienen poco efecto sobre la extracción de PAH's en muestras fortificadas. Además, las recuperaciones en las muestras reales regularmente son menores que las obtenidas en muestras fortificadas. Esto indica que la forma en como se fijan los PAH's sobre el sólido influye en la fuerza de retención así también como puede influir la naturaleza del sólido al que se fijan los PAH's.

Ya que para todos los parámetros se obtienen recuperaciones entre el 70 y 80%, se decidió trabajar con condiciones no tan drásticas para la resistencia de la celda de flujo de extracción. Es así, que se trabajó a potencias del 20% y en una proporción de disolventes de 4 a 1 de hexano/etanol, respectivamente. En este caso se trabajó con un tiempo de irradiación de 1 minuto, ya que el material de la celda y el sistema no resisten las altas presiones que se generan al momento de la extracción si se incrementa el periodo de tiempo de extracción.

3.3 EXTRACCIONES CON LA CELDA DE EXTRACCIÓN EN FLUJO.

Uno de los principales problemas con los sistemas de extracción con horno de microondas, es el mismo que se presenta en la técnica de extracción soxhlet convencional, las grandes cantidades de disolvente para llevar a cabo las extracciones. El utilizar estos grandes volúmenes de disolvente requiere de una etapa adicional al proceso de extracción, la evaporación del disolvente para preconcentrar los analitos. Esta etapa representa sin duda un aumento al tiempo total de análisis de por los menos una hora. Una de las ventajas de utilizar la celda de extracción en flujo, diseñada en este trabajo, es que no requiere de esta etapa de preconcentración. Esta ventaja representa un ahorro de disolvente y tiempo.

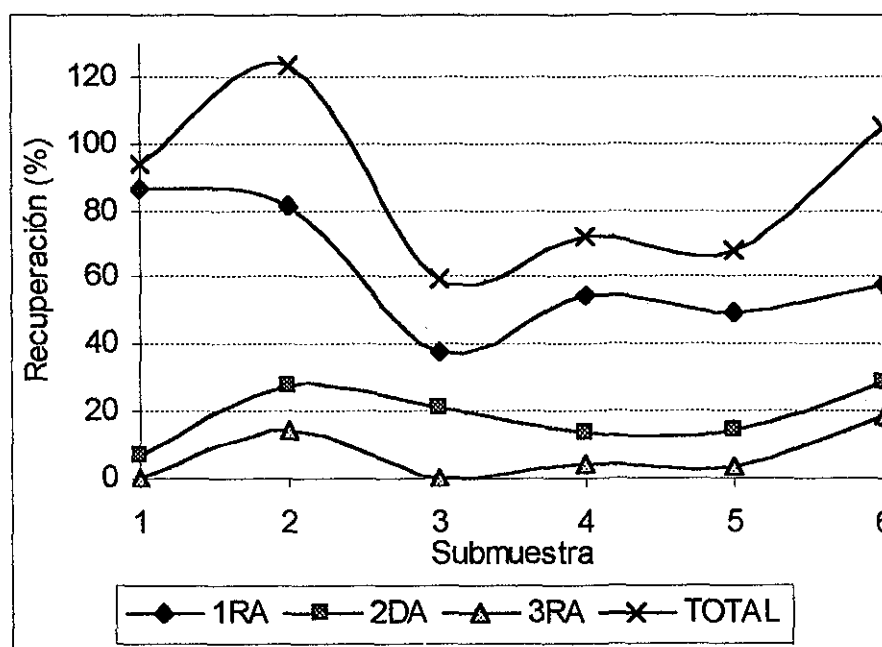
En este estudio se llevaron a cabo las extracciones sobre muestras fortificadas con fluoreno utilizando los siguientes disolventes extractantes: mezcla hexano:etanol (4:1), agua y hexano. Para las extracciones con hexano:etanol (4:1) se trabajó a una potencia del 20%; para agua se trabajó a potencias del horno de microondas de 20% y 50%; y para hexano como disolvente extractante, se trabajó a potencias del 20% y del 80%. El hecho de probar el sistema de extracción con agua como disolvente extractante fue para comparar su eficiencia con la de los demás disolventes y con el método de extracción soxhlet. Ya se comentó en la sección 1.7 sobre la capacidad del agua como disolvente extractante de compuestos orgánicos en matrices sólidas.

Más adelante se compararán las recuperaciones obtenidas en la celda de flujo de extracción con las recuperaciones logradas con soxhlet.

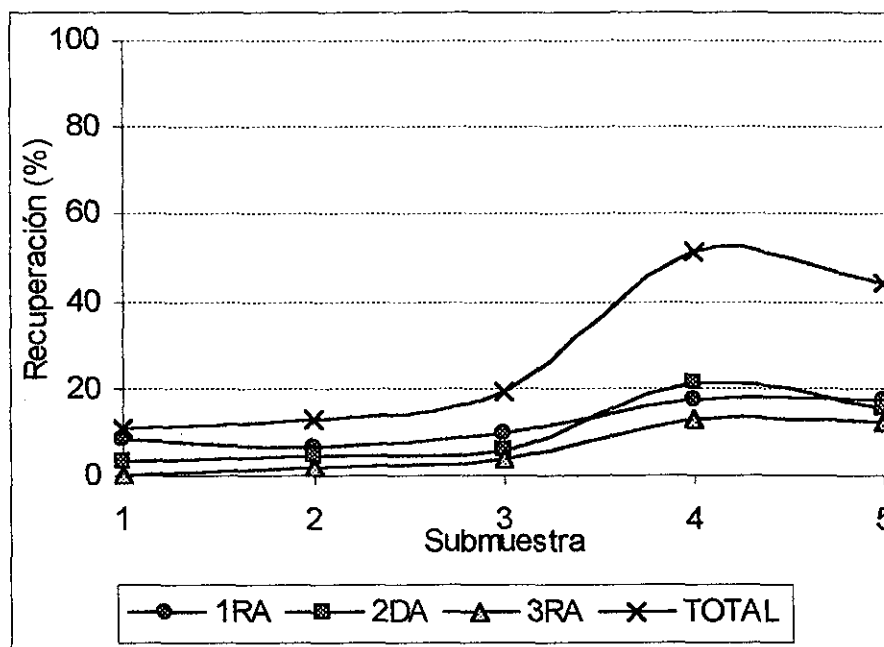
3.3.1 EXTRACCIONES CON EL MÉTODO DE FORTIFICACIÓN EN ROTAVAPOR (Método 5).

Este estudio se hizo con la mezcla hexano:etanol (4:1) y agua como disolventes extractantes. Para este estudio se utilizó el Método 5 para hacer las fortificaciones, el método del horno y la celda (referirse al Método 4 para las extracciones, sección 2.4) depara hacer las extracciones y el método de cuantificación descrito en la sección 2.5.

La Gráfica 5 muestra las recuperaciones obtenidas de seis submuestras extraídas en el horno de microondas con la celda de flujo de extracción usando hexano:etanol (4:1) como mezcla extractante. A cada submuestra se le hicieron tres extracciones sucesivas. También en la Grafica 6 se muestran las recuperaciones obtenidas de cinco submuestras extraídas con agua como disolvente extractante.



Gráfica 5. Recuperaciones de extracciones utilizando hexano:etanol (4:1) como mezcla extractante. Se trabajó a una potencia del 20% durante 1 minuto. Aquí se muestran las recuperaciones de tres extracciones sucesivas (1RA, 2DA y 3RA) y el total de las mismas. Promedio = 86.8%, Desv. Est. = 24.6%, %RSD=28.3%. Las muestras se fortificaron a 140 mg / Kg de tierras.



Gráfica 6. Recuperaciones de extracciones utilizando agua como disolvente extractante. Se trabajó a una potencia del 20% durante 1 minuto. Aquí se muestran las recuperaciones de tres extracciones sucesivas (1RA, 2DA y 3RA) y el total de las mismas. Promedio = 27.9%, Desv. Est. = 18.7%, %RSD=70.0%. Las muestras se fortificaron a 140 mg / Kg de tierras.

Los parámetros estadísticos de la reproducibilidad lograda con el sistema de extracción propuesto en este trabajo se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Parámetros estadísticos para las extracciones hechas en la celda de flujo de extracción utilizando la hexano:etanol (4:1) y agua como disolventes extractantes^a.

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	DISOLVENTE EXTRACTANTE	
	hexano:etanol (4:1)	agua
Promedio (%)	86.8	27.9
Desviación estándar (%)	24.6	18.7
% RSD	28.3	70.0

^a Se trabajó a una potencia del 20% durante 1 minuto con muestras fortificadas a 140 mg / Kg de tierras.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los resultados de la tabla anterior no muestran buena reproducibilidad de las extracciones con ninguno de los dos disolventes extractantes ya que para la mezcla hexano:etanol (4:1) el valor del porcentaje de RSD es de 28.3% mientras que para agua es de 70%. En lo que se refiere a las recuperaciones, los mejores resultados se obtienen con la mezcla hexano:etanol(4:1) con un promedio del 87% contra solo un 28% para las extracciones con agua. Estos resultados son los que en realidad se esperan ya que la mezcla tiene un mayor poder extractante que el agua.

Uno de los posibles problemas que puede surgir, resultado de fortificar una muestra y tomar de la misma varias submuestras, es que la composición de fluoreno no sea la misma en todas las submuestras; es decir, no haya homogeneidad en la composición. En la siguiente sección se seguirán haciendo extracciones con la celda de extracción en flujo; sin embargo, se cambiará el método de fortificación para obtener mayor reproducibilidad en las extracciones.

3.3.2 EXTRACCIONES CON EL MÉTODO DE FORTIFICACIÓN EN REPOSO.

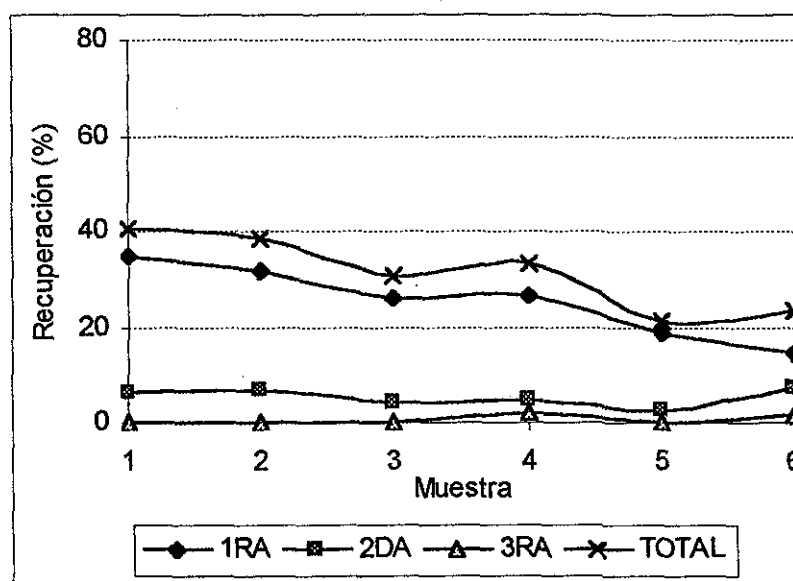
Este estudio es similar al estudio hecho en la sección 3.3.2. La diferencia es que ahora se utilizó un método completamente diferente para fortificar las muestras, se utilizó el método de fortificación en reposo, el cual corresponde al Método 6, descrito en la sección 2.3. Por otra parte, además de trabajar con la mezcla hexano:etanol (4:1) y agua como disolventes extractantes se hicieron extracciones con hexano para poder comparar así las recuperaciones con las obtenidas con los otros dos disolventes mencionados.

Con el método de fortificación en reposo, toda la muestra es sometida al proceso de extracción. El método de extracción y el método de cuantificación fueron los mismos que se utilizaron en la sección 3.3.1; es decir, se utilizó el método de extracción con la celda (Método 4 (CE), sección 2.4).

A continuación se dan los resultados de las recuperaciones obtenidas en las extracciones con los diferentes disolventes extractantes utilizados.

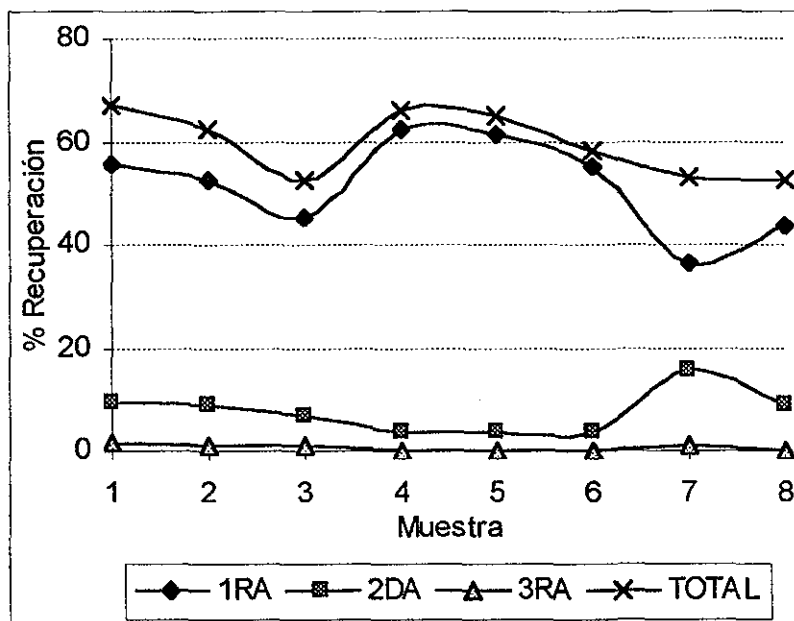
3.3.2.1 EXTRACCIONES UTILIZANDO HEXANO:ETANOL (4:1) COMO MEZCLA EXTRACTANTE.

Las extracciones realizadas con esta mezcla extractante se hicieron bajo las siguientes condiciones: potencia fija de irradiación del 20%, tiempo de irradiación fijo de 1 minuto y composiciones de fluoreno en la muestra de 60 y 120 mg / Kg de tierras diatomáceas. Los resultados de los porcentajes de recuperación obtenidos con la mezcla hexano:etanol (4:1) como disolvente extractante se dan en las Gráficas 7 y 8.



Gráfica 7. Recuperaciones de tres extracciones sucesivas (1RA, 2DA y 3RA) hechas en el horno de microondas sobre la misma muestra con la celda de flujo de extracción utilizando hexano:etanol (4:1) como mezcla extractante. Se trabajó a una potencia del 20% durante 1 minuto. Promedio = 31.2%, Desv. Est. = 7.9%, %RSD=25.2%. Las muestras se fortificaron a 60 mg / Kg de tierras.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

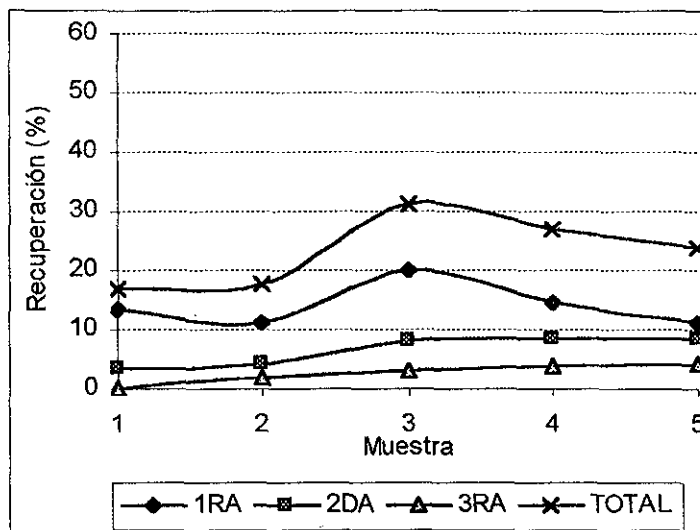


Gráfica 8. Recuperaciones de tres extracciones sucesivas (1RA, 2DA y 3RA) hechas en el horno de microondas sobre la misma muestra con la celda de flujo de extracción utilizando hexano:etanol (4:1) como mezcla extractante. Se trabajó a una potencia del 20% durante 1 minuto. Promedio = 59.5%, Desv. Est. = 6.4%, %RSD = 10.7%. Las muestras se fortificaron a 120 mg / Kg de tierras.

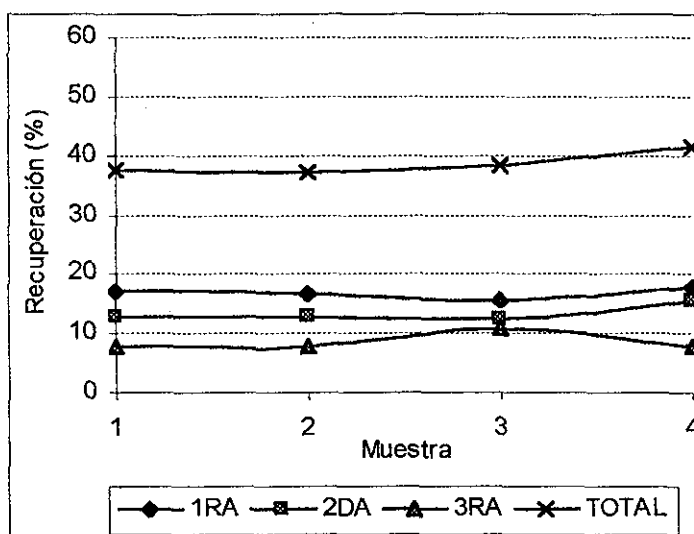
Los resultados demuestran que se obtienen mejores recuperaciones para las muestras fortificadas a 120 mg / Kg de tierras que a 60 mg / Kg de tierras, 59.5% y 31.2%, respectivamente. La desviación estándar es muy similar para ambos tipos de muestras aunque debido a la mayor recuperación en las muestras fortificadas a 120 mg / Kg, la reproducibilidad es mejor para las recuperaciones de estas muestras con un porcentaje de RSD del 10.7% contra 25.2% para 60 mg / Kg.

3.3.2.2 EXTRACCIONES UTILIZANDO AGUA COMO DISOLVENTE EXTRACTANTE.

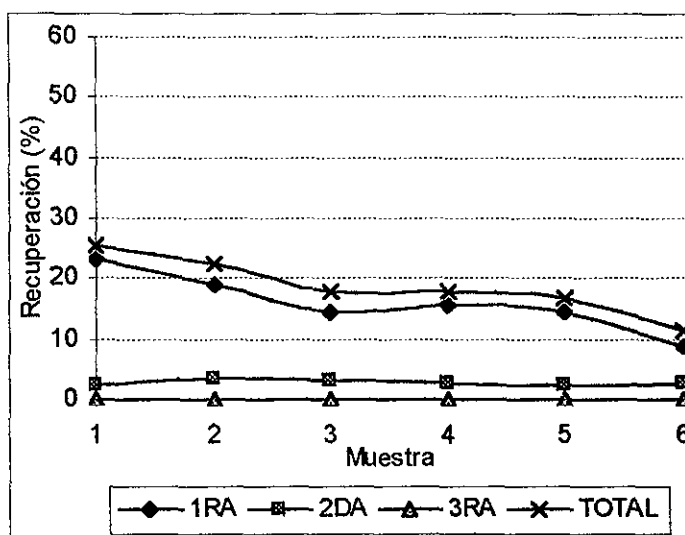
En las Gráficas 9, 10, 11 y 12 se presentan los resultados de extracciones hechas en horno de microondas con la celda de extracción en flujo a potencias de 20% y 50%. Se trabajó con muestras fortificadas de fluoreno a 60 mg/Kg y 120 mg/Kg de tierras.



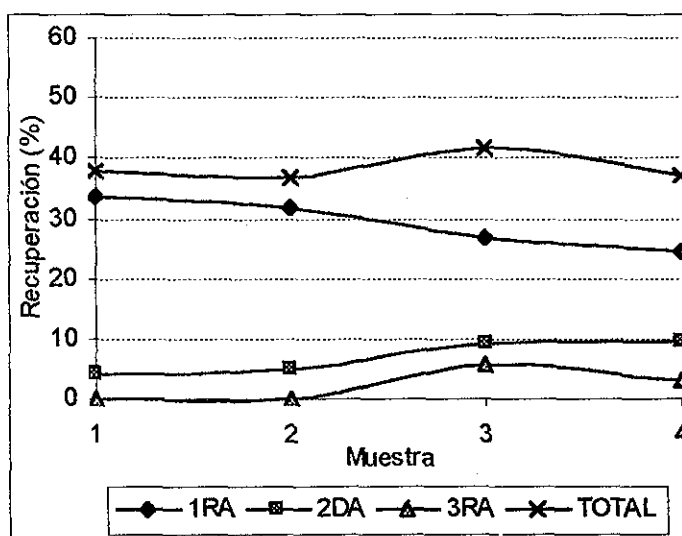
Gráfica 9. Recuperaciones de extracciones utilizando agua como disolvente extractante. Se trabajó a una potencia del 20% durante 1 minuto. Se muestran las recuperaciones de tres extracciones sucesivas (1RA, 2DA y 3RA) y el total de las mismas. Promedio = 23.3%, Desv. Est. = 6.1%, %RSD=26.2%. Las muestras están fortificadas a 60 mg/Kg de tierras.



Gráfica 10. Recuperaciones de extracciones utilizando agua como disolvente extractante. Se trabajó a una potencia del 20% durante 1 minuto. Se muestran las recuperaciones de tres extracciones sucesivas (1RA, 2DA y 3RA) y el total de las mismas. Promedio = 38.6%, Desv. Est. = 1.9%, %RSD=4.96%. Las muestras están fortificadas a 120 mg/Kg de tierras.



Gráfica 11. Recuperaciones de extracciones utilizando agua como disolvente extractante. Se trabajó a una potencia del 50% durante 1 minuto. Aquí se muestran las recuperaciones de tres extracciones sucesivas (1RA, 2DA y 3RA) y el total de las mismas. Promedio = 18.6%, Desv. Est. = 4.8%, %RSD=25.8%. Las muestras están fortificadas a 60 mg/Kg de tierras.



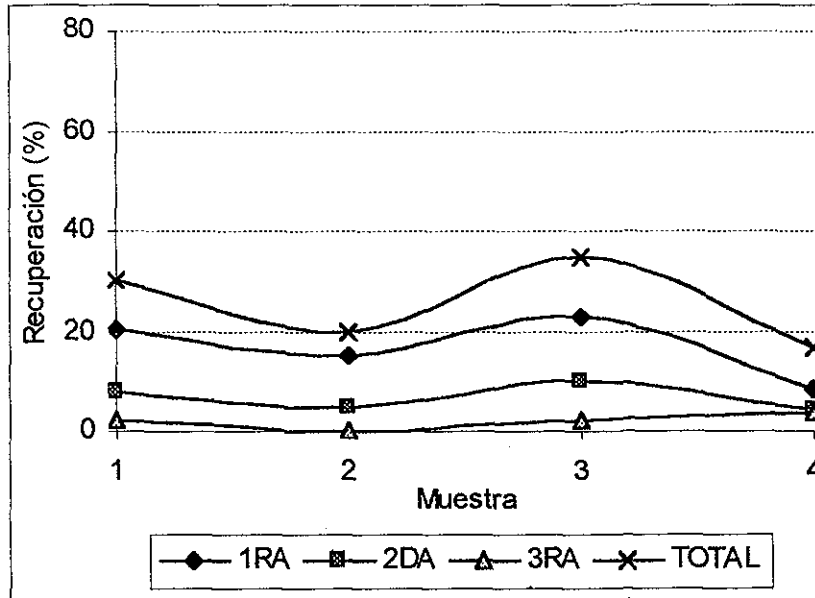
Gráfica 12. Recuperaciones de extracciones utilizando agua como disolvente extractante. Se trabajó a una potencia del 50% durante 1 minuto. Se muestran las recuperaciones de tres extracciones sucesivas (1RA, 2DA y 3RA) y el total de las mismas. Promedio = 38.3%, Desv. Est. = 2.4%, %RSD=6.2%. Las muestras están fortificadas a 120 mg/Kg de tierras.

Las cuatro gráficas anteriores muestran que es posible extraer fluoreno de las tierras diatomáceas utilizando agua como disolvente extractante aunque en menor proporción que con la mezcla hexano:etanol (4:1), pero aún así el agua a altas temperaturas se puede utilizar para extraer fluoreno.

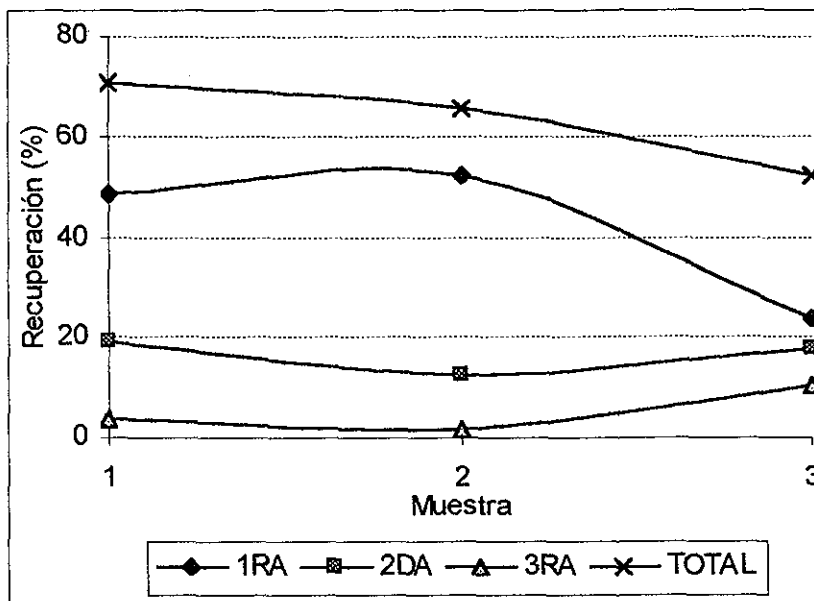
Comparando las Gráficas 9, 10 y 11, 12 las cuales están fortificadas a 60 y 120 mg/Kg, respectivamente, se puede observar que los porcentajes totales de recuperación son similares para potencias de 20% y 50%. Aparentemente no hay ningún beneficio al utilizar potencias mayores; sin embargo, en la primera extracción sucesiva (1RA), para potencias de 50%, se logra recuperar la mayor parte del fluoreno total mientras que para potencias de 20% se requiere de tres extracciones para lograr extraer el mismo porcentaje. Este hecho demuestra como aumenta el poder extractante del agua al elevar la temperatura, lo cual se consigue aplicando mayores potencias de irradiación hacia la celda.

3.3.2.3 EXTRACCIONES UTILIZANDO HEXANO COMO DISOLVENTE EXTRACTANTE.

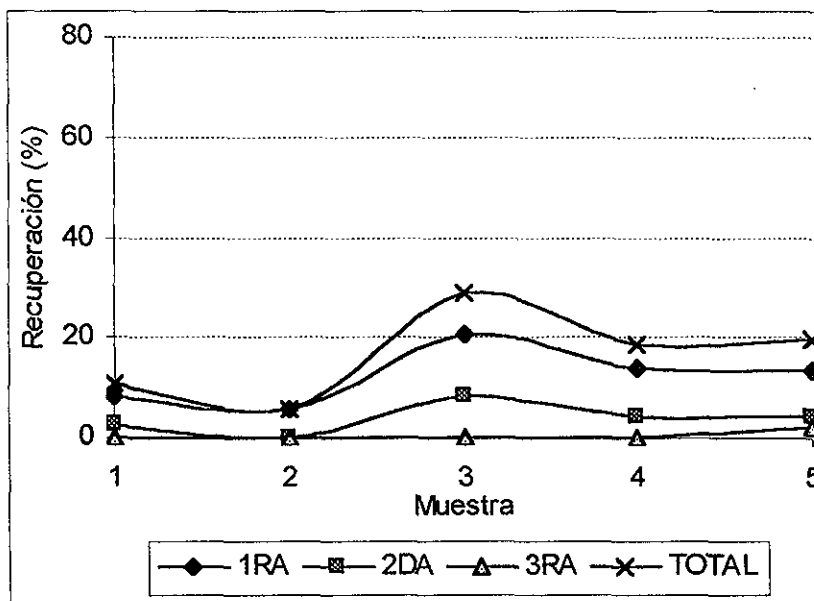
Se hicieron también extracciones utilizando hexano como disolvente extractante en el horno de microondas, pudiendo comparar así las recuperaciones con los disolventes ya utilizados en esta sección. En principio, el hexano no es un disolvente que absorba las microondas pero puede darse la interacción de las microondas con el fluoreno y de esta manera proporcionar la energía necesaria para que éste sea extraído. Para este disolvente se trabajó a potencias de 20% y 80% para muestras fortificadas con fluoreno a 60 mg/Kg y 120 mg/Kg. Los resultados se muestran en las Gráficas 13, 14, 15 y 16.



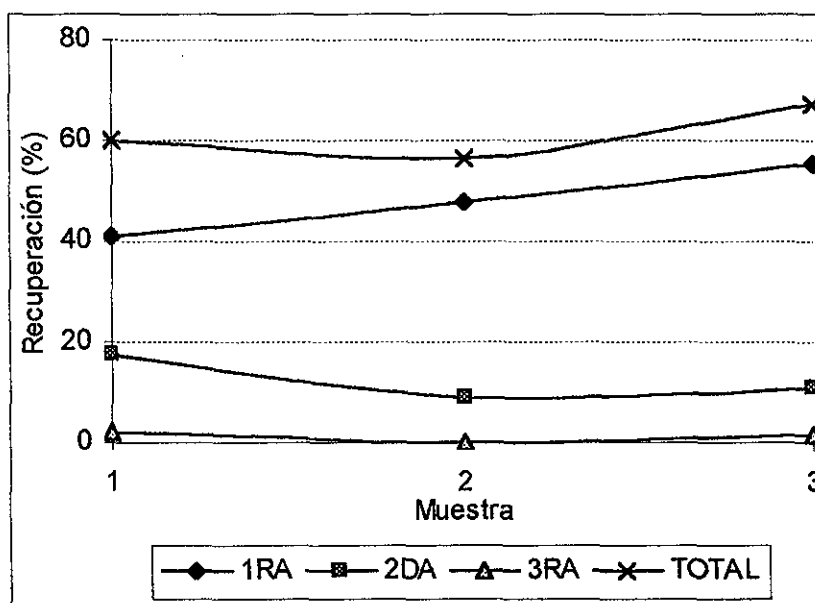
Gráfica 13. Recuperaciones de extracciones hechas en el horno de microondas de muestras fortificadas con fluoreno. Las muestras se fortificaron a 60 mg/Kg de tierras y se trabajó a una potencia de 20%. Se uso hexano como disolvente extractante. Promedio = 25.2%, Desv. Est. = 8.6%, %RSD = 33.9%.



Gráfica 14. Recuperaciones de extracciones hechas en el horno de microondas sobre muestras fortificadas con fluoreno. Las muestras se fortificaron a 120 mg/Kg de tierras y se trabajó a una potencia de 20%. Se uso hexano como disolvente extractante. Promedio = 62.8%, Desv. Est. = 9.8%, %RSD = 15.6%.



Gráfica 15. Recuperaciones de extracciones hechas en el horno de microondas sobre muestras fortificadas con fluoreno. Las muestras se fortificaron a 60 mg/Kg de tierras y se trabajó a una potencia de 80%. Se usó hexano como disolvente extractante. Promedio = 16.7%, Desv. Est. = 9.0%, %RSD = 53.7%.



Gráfica 16. Recuperaciones de extracciones hechas en el horno de microondas sobre muestras fortificadas con fluoreno. Las muestras se fortificaron a 120 mg/Kg de tierras y se trabajó a una potencia de 80%. Se usó hexano como disolvente extractante. Promedio = 61.3%, Desv. Est. = 5.6%, %RSD = 9.2%.

Para las extracciones con hexano como disolvente extractante, es notoria la diferencia en las recuperaciones obtenidas en las muestras fortificadas a 60 y 120 mg/Kg de tierras. Para 60 mg/Kg el promedio de recuperación es alrededor de 20% mientras que para 120 mg/Kg la recuperación promedio es del 60%. La tendencia de que la recuperación es directamente proporcional a la cantidad de fluoreno en las muestras fortificadas se ha venido presentando en extracciones anteriores con hexano:etanol (4:1) y agua. Comparando las Gráficas 13 con 15 y 14 con 16, se obtienen recuperaciones parecidas, lo cual indica que al parecer el porcentaje de recuperación no depende de la potencia, aunque para las Gráficas 13 y 15 no es notorio debido a la gran irreproducibilidad, 34% y 54% en porciento de RSD, respectivamente.

3.3.2.4 EXTRACCIONES CON SOXHLET.

Con el fin de comparar los resultados obtenidos con la celda de extracción en flujo se utilizó como método de extracción estándar la extracción soxhlet. El método de extracción soxhlet sigue siendo hoy en día un método estándar para recuperar una diversa cantidad de compuestos orgánicos de matrices sólidas. Al igual que los métodos de extracción con horno de microondas, no hay un método de referencia en particular por soxhlet en que se utilice el mismo tiempo de duración del proceso de extracción, la mayoría de los investigadores no menciona un método estándar a seguir. Los tiempos de extracción para soxhlet van de 6 hrs hasta 24 hrs de duración.

Para comparar los resultados hasta aquí obtenidos, se hicieron extracciones con el Método de Extracción Soxhlet descrito en la sección 2.4. La fortificación de las muestras se llevó a cabo por el Método de Fortificación en Reposo, descrito en la sección 2.3 como Método 6 y a una composición de 60 mg/Kg de tierras.

Los resultados de tres extracciones realizadas por soxhlet se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Recuperaciones de tres extracciones por soxhlet en muestras fortificadas en reposo con fluoreno a 60 mg/Kg de tierras^a.

RECUPERACIÓN DE EXTRACCIÓN			PARÁMETROS ESTADÍSTICOS		
1	2	3	PROMEDIO	DESV. EST.	% RSD
19.7	23.7	21.0	21.5	2.0	9.5

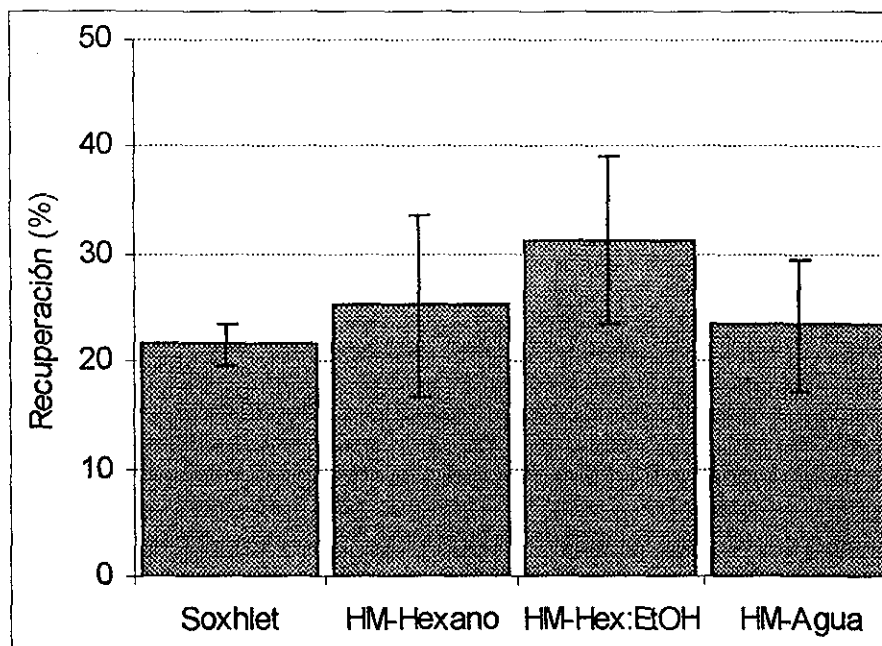
^a El periodo de extracción fue de 6 hrs y se utilizó hexano como disolvente extractante. La evaporación del disolvente se realizó en un sistema de evaporación Kudema-Danish.

De acuerdo con los resultados de la tabla anterior, las recuperaciones de fluoreno son muy bajas comparados con los resultados obtenidos con la celda de extracción en flujo; de hecho, son las recuperaciones más bajas que se han obtenido; sin embargo, la extracción con soxhlet tiene la característica de ser un sistema muy reproducible.

3.3.2.5 COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.

En esta sección se presentaron los resultados de las extracciones hechas en la celda de extracción utilizando dos métodos completamente diferentes de fortificación. Inicialmente se trabajó con el Método de Fortificación en Rotavapor (Método 5); sin embargo, con este método se obtuvieron resultados poco reproducibles en las extracciones con un porcentaje de RSD del 30%; así es que se decidió cambiar por un método de fortificación más sencillo y a la vez más confiable, el Método de Fortificación en Reposo (Método 6).

En la Gráfica 17 se comparan los resultados de las recuperaciones obtenidas con los métodos de extracción: soxhlet y con la celda de extracción en flujo, este último con los diferentes disolventes con los que se trabajó: mezcla hexano:etanol (4:1), hexano y agua. Se presenta la reproducibilidad de cada uno de ellos en términos de la desviación estándar.



Gráfica 17. Recuperaciones de los métodos de extracción soxhlet y con la celda de extracción en horno de microondas. Los disolventes utilizados para el horno de microondas están marcados en la gráfica como: HM-Hexano para hexano, HM-Hex:EtOH para hexano:etanol (4:1) y HM-Agua para agua. Las barras de error de cada método están dadas en términos de la desviación estándar. Las muestras se fortificaron a 60 mg/kg de tierras.

Los resultados de la Gráfica 17 nos indican que el sistema de extracción propuesto en este trabajo es muy similar al sistema soxhlet; de hecho ligeramente mayor. No obstante, no se puede decir lo mismo con los resultados de reproducibilidad ya que con soxhlet se obtiene una desviación estándar del 2%, mientras que para las recuperaciones obtenidas con la celda de extracción la desviación está alrededor del 8%.

Otro aspecto importante por resaltar es la eficiencia del agua como disolvente extractante en relación con los demás disolventes y el método de extracción soxhlet. Las ventajas de utilizar agua como disolvente extractante son evidentes y algunas de las más importantes son: disolvente no tóxico para los ecosistemas, disponibilidad a bajo costo y de fácil manejo, aunque esto depende de que compuestos se quieran extraer y el tipo de muestra.

3.4 REPRODUCIBILIDAD DEL SISTEMA DE EXTRACCIÓN.

Los resultados de las extracciones con la celda de extracción en flujo realizados en la sección anterior, tanto para el Método de Fortificación en Rotavapor (Método 5) como para el Método de Fortificación en Reposo (Método 6), se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados de extracciones con horno de microondas (HM) y con Soxhlet^a.

MÉTODO	% RECUPERACIÓN	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	% RSD	MÉTODO DE FORTIFICACIÓN
HM-hexano:etanol (4:1)	86.8	24.6	28.3	Rotavapor
HM-agua	27.9	18.7	70.0	Rotavapor
HM-hexano:etanol (4:1)	31.2	7.9	25.2	Reposo
HM-hexano	25.2	8.5	33.9	Reposo
HM-agua	23.3	6.1	26.2	Reposo
Soxhlet-hexano	21.5	2.0	9.5	Reposo

^a Se trabajó con hexano:etanol (4:1), hexano y agua como disolventes extractantes. El método de fortificación en rotavapor se trabajó con muestras fortificadas a 140 mg/Kg de tierras, mientras que las muestras extraídas con el método de fortificación en reposo se fortificaron a 60 mg/Kg de tierras. Para las extracciones en horno de microondas se trabajó con potencias del 20%.

De la tabla anterior se pueden observar aspectos interesantes con respecto a los métodos de fortificación y, a la reproducibilidad en las recuperaciones logradas con cada uno de los métodos de extracción. Con respecto a los métodos de fortificación, se puede decir que el método de fortificación en reposo, cuando se utiliza el total de la muestra, genera los mejores resultados de reproducibilidad. No obstante, aunque las muestras se fortificaron con diferentes cantidades de fluoreno, se analizará si estas diferencias se deben a las composiciones de fluoreno o realmente se deben a los métodos de fortificación como se menciona en la siguiente sección. Con respecto a los métodos de extracción se puede observar que hay mayor variabilidad en las recuperaciones obtenidas con la celda de extracción que con soxhlet. Este aspecto también se analizará en la siguiente sección, en donde se hicieron pruebas de reproducibilidad del sistema de extracción.

Hay tres posibles causas que pueden originar la dispersión de las recuperaciones con la celda de extracción, cuando las muestras se fortifican en rotavapor. La primera de ellas es que las submuestras, tomadas de la muestra fortificada, no sean homogéneas en cuanto a la cantidad de fluoreno adsorbido sobre las mismas. Problema que aparentemente ya había sido solucionado con el mezclado por 15 minutos en seco en la etapa de fortificación. La segunda causa puede ser el método de extracción, el cual no esté dando resultados reproducibles. La última causa podría ser la inestabilidad del fluoreno. Estos tres factores se analizarán más profundamente en esta sección.

Previo a los estudios de estabilidad del fluoreno se probó la reproducibilidad del sistema de extracción: Prueba A - calentamiento de la celda y Prueba B - recuperación del fluoreno, esto último en cuanto a posibles pérdidas por fugas en el sistema y/o pérdidas por evaporación.

3.4.1 REPRODUCIBILIDAD EN EL CALENTAMIENTO DEL SISTEMA.

Esta prueba se hizo en dos días y a diferentes horas del día para estudiar si existía algún factor que pudiese afectar la eficiencia de calentamiento del sistema.

Prueba A – 1.- Se enjuagó la celda con agua y con ayuda de una jeringa se eliminó el agua en la tubería de entrada y salida de la celda. 2.- Se vertieron 10 mL de agua destilada con una pipeta volumétrica de 10 mL, se tapó la celda y se colocó dentro del horno. 3.- Se calentó la celda a 20% de potencia durante 1 minuto. 4.- Se midió, con una regla, sobre el tubo de la parte inferior de la celda la distancia de expansión del agua.

Si no hay fugas en el sistema y el horno de microondas calienta de igual manera de una extracción a otra, se obtendrán expansiones reproducibles del agua dentro del sistema. Los resultados de la reproducibilidad en el calentamiento del sistema se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Expansiones de agua en el sistema de extracción^a.

MEDIDA	DÍA	HORA	EXPANSIÓN	POTENCIA
1	1	14:02	43.3 cm	20 %
2	1	14:15	43.5 cm	20 %
3	1	15:49	43.4 cm	20 %
4	1	17:15	42.0 cm	20 %
5	1	17:40	42.5 cm	20 %
6	1	18:02	42.6 cm	20 %
7	1	18:44	43.3 cm	20 %
8	1	19:03	42.8 cm	20 %
PROMEDIO =			42.92	
DESV. EST. =			0.53	
% RSD =			1.24	

MEDIDA	DÍA	HORA	EXPANSIÓN	POTENCIA
1	2	11:01	41.2 cm	20 %
2	2	11:33	42.1 cm	20 %
3	2	12:32	41.9 cm	20 %
4	2	13:06	42.2 cm	20 %
5	2	13:39	42.6 cm	20 %
6	2	15:13	41.6 cm	20 %
7	2	15:33	41.7 cm	20 %
8	2	16:15	43.7 cm	20 %
PROMEDIO =			42.12 cm	
DESV. EST. =			0.76 cm	
% RSD =			1.81	

^a Las mediciones se hicieron en dos diferentes días y a diferentes horas del día a una potencia del horno de 20 % durante 1 minuto. Para cada día se presentan los parámetros estadísticos: promedio, desviación estándar y %RSD.

Los resultados de esta parte del estudio demuestran que el sistema de extracción es reproducible en cuanto al calentamiento. De hecho los resultados de la Tabla 12 no muestran ninguna tendencia en cuanto a la variación en el calentamiento a través del tiempo; las diferencias entre las mediciones determinan la precisión del calentamiento del sistema de extracción.

3.4.2 REPRODUCIBILIDAD DEL SISTEMA DE EXTRACCIÓN.

Una vez demostrado que el sistema de calentamiento es reproducible se realizaron las pruebas para verificar posibles pérdidas de fluoreno debido a fugas en el sistema de extracción y/o pérdidas por volatilización del fluoreno. Esta prueba se hizo por cuadruplicado y los resultados se muestran en la Tabla 13.

Prueba 2 – 1.- Se colocó una tira de papel filtro prelavado (1cm X 0.5cm) en el orificio del fondo de la celda. 2.- Se pesó 1 gr. de tierras diatomáceas y se puso en la celda. 3.- Se pusieron 100 esferas de vidrio (4 mm de diámetro) en la celda. 4.- Se vertieron 9 mL, con una pipeta volumétrica, de una disolución de fluoreno en hexano de 6 ppm en la celda. 5.- Se calentó la celda durante 1 minuto a 80% de potencia 6.- Se vertió el extracto a un matraz volumétrico de 10 mL, sumergido en un baño de agua, y se aforó con hexano.

Nota: Para la comparación se hizo una dilución del estándar de fluoreno de 6 ppm llevando un volumen de 9 mL a 10 mL en un matraz volumétrico quedando una concentración de 5.40 ppm.

Tabla 13. Repetibilidad en la recuperación de disoluciones de fluoreno en hexano^a.

MUESTRA	ABSORBANCIA	CONC. REAL	% REC
Blanco	0.065	***	***
Estándar	0.704	5.40 ppm	-----
Replica 1	0.659	5.02 ppm	92.96
Replica 2	0.653	4.97 ppm	92.04
Replica 3	0.646	4.91 ppm	90.93
Replica 4	0.666	5.08 ppm	94.07
		PROMEDIO =	92.50 %
		DESV. EST. =	1.34 %
		% RSD =	1.44 %

^a Disoluciones sometidas al procedimiento de extracción en horno de microondas y con la celda de flujo de extracción. La disolución del estándar sirvió como referencia y se hicieron la mediciones de absorbancia por espectroscopia UV.

*** Esta es la señal que corresponde a la extracción de un blanco de tierras libre de PAH's, la absorbancia de este blanco no es significativa ya que es muy similar a la absorbancia del disolvente puro.

Los resultados de la tabla anterior demuestran buena repetibilidad en las recuperaciones ya que se obtiene un porcentaje de RSD tan sólo de 1.44% contrario al 28% obtenido con extracciones con muestras fortificadas en rotavapor. Por otra parte, el motivo por el cual el porcentaje promedio de recuperación es de 92.5 % se debe a que parte de la disolución se queda dentro de la celda mojando principalmente a las tierras. Esto no es un problema para el caso de la extracción de muestras fortificadas, ya que se hacen tres extracciones sucesivas que sirven también para recuperar el remanente de fluoreno que haya quedado por residuos de disolvente de reextracciones anteriores.

Descartados dos de los posibles parámetros que pueden afectar en la reproducibilidad de las extracciones: la reproducibilidad en el calentamiento del sistema y la reproducibilidad en el sistema de extracción, queda por analizar si se obtienen submuestras con las mismas características, resultado de una fortificación homogénea. A partir de aquí se hizo un estudio en el cual se prepararon muestras fortificadas individuales

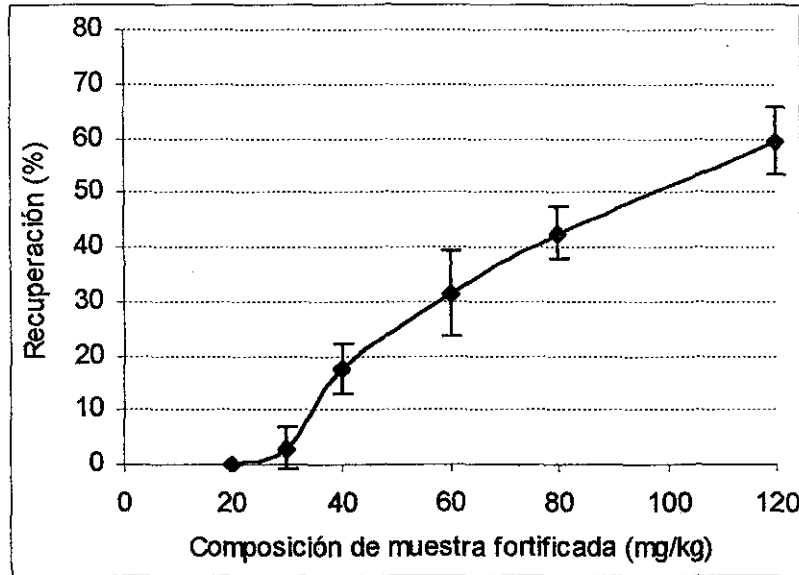
que fueron sometidas al sistema de extracción. Además, el estudio también se hizo para muestras fortificadas con diferentes cantidades de fluoreno para observar si afectaba este parámetro en las recuperaciones.

3.4.3 RECUPERACIONES DE EXTRACCIONES SOBRE MUESTRAS FORTIFICADAS CON DIFERENTES CANTIDADES DE FLUORENO.

En este estudio se hicieron extracciones en la celda de extracción en flujo sobre muestras fortificadas en reposo a diferentes composiciones de fluoreno para saber si hay diferencias en los porcentajes de recuperación. Este estudio se hizo para saber si las diferencias encontradas en los dos métodos de fortificación, en rotavapor y en reposo, se deben a diferencias en los métodos en sí o si se deben al nivel de composición de fluoreno en las muestras fortificadas. Las muestras se fortificaron a 20, 30, 40, 60, 80 y 120 mg/Kg de tierras. Los procedimientos de fortificación y de extracción utilizados en este estudio se muestran a continuación.

Para este estudio se siguieron el Método de Fortificación en Reposo (Método 6) y el Método de Extracción con la Celda de extracción (Método 4), descritos en las secciones 2.3 y 2.4, respectivamente.

La Gráfica 18 muestra las recuperaciones de fluoreno de muestras fortificadas a diferentes composiciones de fluoreno.



Gráfica 18. Recuperaciones de fluoreno de muestras fortificadas en reposo. La extracción se hizo en el horno de microondas a 20% de potencia durante un minuto, utilizándose hexano:etanol (4:1) como mezcla extractante. Las barras de error están dadas en términos de la desviación estándar.

La razón de que las recuperaciones para las extracciones de la Gráfica 7 sean más pequeñas que las obtenidas en la Gráfica 5, 31.2% y 86.8%, respectivamente, se explica en la Gráfica 18. Esta última gráfica nos muestra que las recuperaciones de fluoreno son directamente proporcionales a la composición de fluoreno en la muestra fortificada. Extrapolando en la Gráfica 18 a una composición de fluoreno en la muestra fortificada de 140 mg/Kg de tierras, se obtiene aproximadamente una recuperación del 80%, recuperación muy similar al promedio encontrado para las muestras que aparecen en la Gráfica 5, las cuales están fortificadas con fluoreno a 140 mg / Kg de tierras.

Un motivo por el cual las recuperaciones varían en relación directa a la composición en la muestra fortificada se puede deber a que las tierras se saturan de fluoreno con poca cantidad de éste, siendo más fácil para el sistema de extracción desadsorberlo de las tierras al estar retenido con menor fuerza.

3.4.4 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DEL FLUORENO.

El objetivo de estos estudios es conocer la estabilidad del fluoreno, comparado con otros PAH's, a diferentes tiempos de extracción; así como la influencia de las tierras diatomáceas como soporte adsorbente. Se siguió trabajando con el Método de Fortificación en Reposo (Método 6) descrito en la sección 2.3 y se utilizó un método de extracción manual (Método 5), el cual es más simple, y con el cual se puede seguir tener control en las posibles pérdidas de fluoreno durante estas etapas.

3.4.4.1 ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL FLUORENO SIN UTILIZAR TIERRAS DIATOMÁCEAS.

Se estudió la estabilidad del fluoreno sin utilizar tierras diatomáceas, esto con la finalidad de eliminar algún tipo de interacción entre el fluoreno y las tierras diatomáceas que pudiese ser la causa de la variabilidad en las recuperaciones de fluoreno en las extracciones hechas con horno de microondas.

Además del estudio de estabilidad para fluoreno se hizo también el estudio para tres PAH's mas y así poder comparar la estabilidad entre los mismos. Los cuatro PAH's estudiados fueron: fluoreno, pireno, fenantreno y fluoranteno.

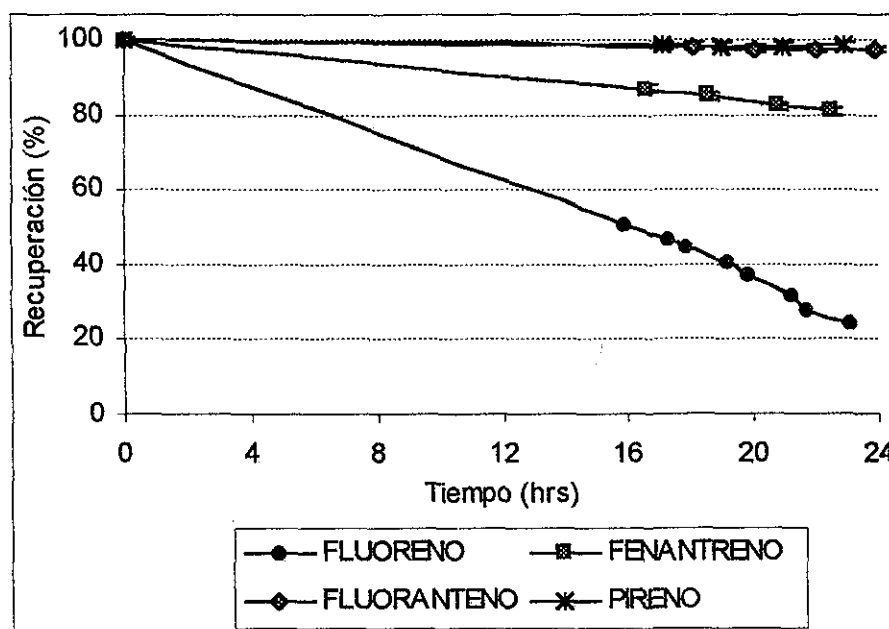
PROCEDIMIENTO

- 1.- Se vertieron 3 mL de la disolución del PAH en hexano, a una concentración de 20 ppm, en un vaso de precipitados de 50 mL.
- 2.- Se tapó con papel filtro y se dejó en reposo toda la noche para que se evaporara el disolvente.

Al día siguiente se siguió con el procedimiento de redisolución (pasos 3 y 4), anotándose la hora a la que se redisolvió el contenido del vaso.

- 3.- Se vertieron porciones de 1.2 mL, aproximadamente, de hexano agitando el vaso manualmente y el extracto se vertió a un matraz volumétrico de 10 mL
- 4.- Se repitió el paso anterior tantas veces hasta llegar a la marca de aforo del matraz.

Los resultados de estabilidad de los cuatro PAH's se muestran en la Gráfica 19. Cada punto de la gráfica representa el promedio de tres replicas hechas a la misma hora.



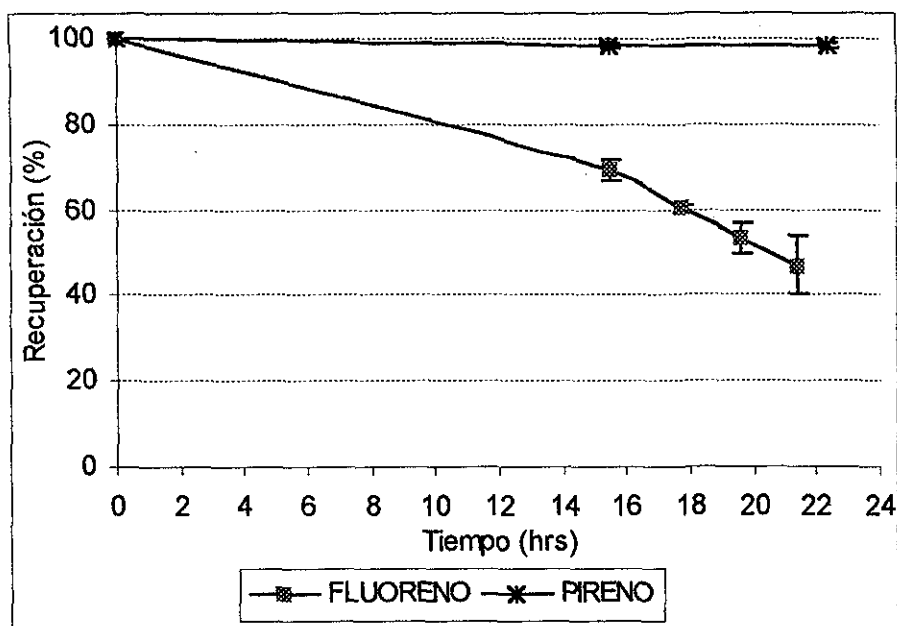
Gráfica 19. Redisoluciones de cuatro PAH's a diferentes horas después de verter cada una de las disoluciones de los PAH's en vasos de precipitados y permitir la evaporación del disolvente durante toda la noche.

La gráfica anterior muestra que el fluoreno es la especie más inestable de los cuatro PAH's estudiados ya que desaparece más rápidamente que los restantes tres PAH's; esto se debe a que de los cuatro PAH's, el fluoreno es el de menor peso molecular y por lo tanto el más volátil. Otra posible causa podría ser la inestabilidad por vía fotoquímica; sin embargo, esto se descartó ya que no se presentaron cambios en los espectros de absorción de los extractos.

3.4.4.2 ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL FLUORENO UTILIZANDO TIERRAS DIATOMÁCEAS.

Este estudio se hizo únicamente para fluoreno y pireno. Las fortificaciones se hicieron en reposo tal y como se describe en el Método 6, descrito en la sección 2.3. El procedimiento de extracción se realizó manualmente de acuerdo al Método 5, descrito en la sección 2.4.

Los estudios de estabilidad se hicieron en relación al tiempo de extracción; es decir, las muestras se fortificaron a la misma hora pero las extracciones se hicieron a diferentes horas. De esta forma, se pudo observar la estabilidad del fluoreno y pireno en las muestras fortificadas a través del tiempo. Los resultados de este estudio se pueden observar en la Gráfica 20.



Gráfica 20. Recuperaciones de fluoreno y pireno a diferentes tiempos de extracción usando el Método de Fortificación en Reposo y el Método de Extracción Manual (M). Se utilizaron tierras diatomáceas para fortificar las muestras. Las barras de error están dadas en términos de la desviación estándar.

La gráfica anterior reconfirma la inestabilidad del fluoreno y la estabilidad del pireno, ya que este último se logra recuperar casi al cien por ciento en las extracciones a diferentes horas. Esto explica la gran variabilidad que se presentó al hacer extracciones con horno de microondas para muestras fortificadas en reposo con fluoreno, ya que aunque las muestras se extraían al siguiente día de fortificarlas, las extracciones no se hacían a la misma hora. De ahí el valor alrededor de 8% para las muestras fortificadas en reposo y extraídas con la celda de extracción, contra el valor de 2% para las muestras extraídas con soxhlet las cuales fueron extraídas a la misma hora, ver Tabla 11.

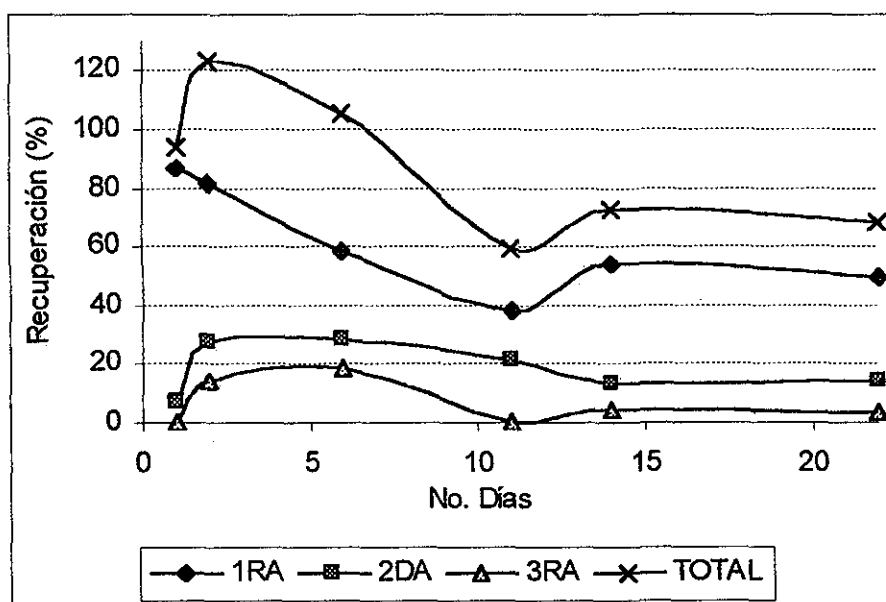
Siguiendo la tendencia de desaparición del fluoreno, éste desaparece totalmente después de 34 hrs. de fortificada la muestra; la Tabla 14 constata este hecho ya que demuestra las diferencias en recuperación de algunas muestras extraídas con horno de microondas pero en diferentes días de fortificada la muestra a 60 mg/kg de fluoreno. En esta tabla se puede observar como el fluoreno ha desaparecido después de 4 y 9 días de fortificada la muestra.

Tabla 14. Recuperaciones obtenidas de extracciones hechas con la celda de flujo de extracción^a.

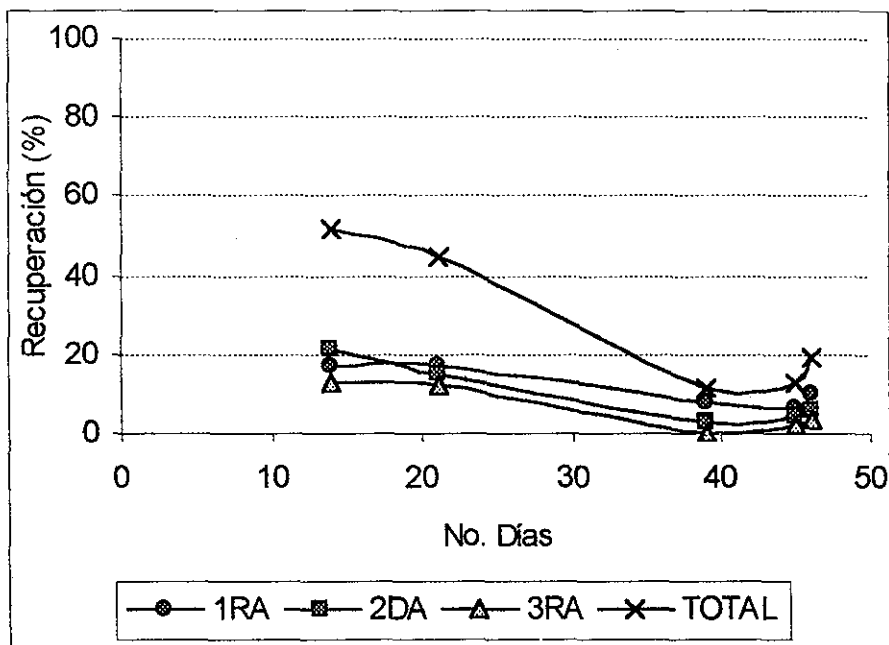
MUESTRA	DÍAS DE FORTIFICACIÓN	EXTRACCIÓN SUCESIVA			EXTRACCIÓN
		1 RA	2 DA	3 RA	TOTAL
F-55	1	34.7	6	0	40.7
F-56	1	31.8	6.6	0	38.4
F-60	1	26.2	4.4	0	30.6
F-61	1	26.3	4.7	2.1	33.1
F-86	4	0	0	0	0
F-87	9	0	0	0	0

^a Extracciones realizadas después de 1, 4 y 9 días de fortificada la muestra en reposo, los días de la fecha de fortificación se muestran en la segunda columna. Se hicieron tres extracciones sucesivas sobre la misma muestra las cuales se indican en la tabla por 1RA, 2DA y 3RA. El total representa la suma de las recuperaciones logrados en las tres extracciones sucesivas. Las recuperaciones están dados en porcentaje con relación a la cantidad de fluoreno con la que se fortificaron las muestras. Las muestras se fortificaron a 60 mg/kg de tierras.

Debido a que la diferencia de tiempo, desde que se fortificaron las muestras hasta el momento de la extracción, es un parámetro importante, al menos para muestras fortificadas con fluoreno; se volvieron a graficar los resultados de las primeras extracciones hechas en el horno de microondas cuando la fortificaciones se hicieron en rotavapor. Modificando el arreglo de las Gráfica 5 y 6, ahora en función del periodo del tiempo ya mencionado, se obtienen las Gráficas 21 y 22, respectivamente.



Gráfica 21. Recuperaciones obtenidas de extracciones hechas en horno de microondas en función del número de días de fortificada la muestra. Se hicieron tres extracciones sucesivas: 1RA, 2DA y 3RA sobre la misma muestra. El total representa la suma de las tres extracciones sucesivas. Se utilizó hexano:etanol (4:1) como mezcla extractante. Las muestras se fortificaron a 140 mg/kg de tierras.



Gráfica 22. Recuperaciones obtenidas de extracciones hechas en horno de microondas en función del número de días de fortificada la muestra. Se hicieron tres extracciones sucesivas: 1RA, 2DA y 3RA sobre la misma muestra. El total representa la suma de las tres extracciones sucesivas. Se utilizó agua como disolvente extractante. Las muestras se fortificaron a 140 mg/kg de tierras.

En estas gráficas se puede observar como la fortificación en rotavapor permite que el fluoreno se adsorba más fuertemente sobre las tierras que haciendo la fortificación en reposo, ya que aun después de 46 días de que se fortificó la muestra, se encuentra un cierto porcentaje de fluoreno en las tierras, el caso contrario ocurre en las fortificaciones en reposo ya que el fluoreno desaparece totalmente a las 34 horas de fortificada la muestra (ver Tabla 14).

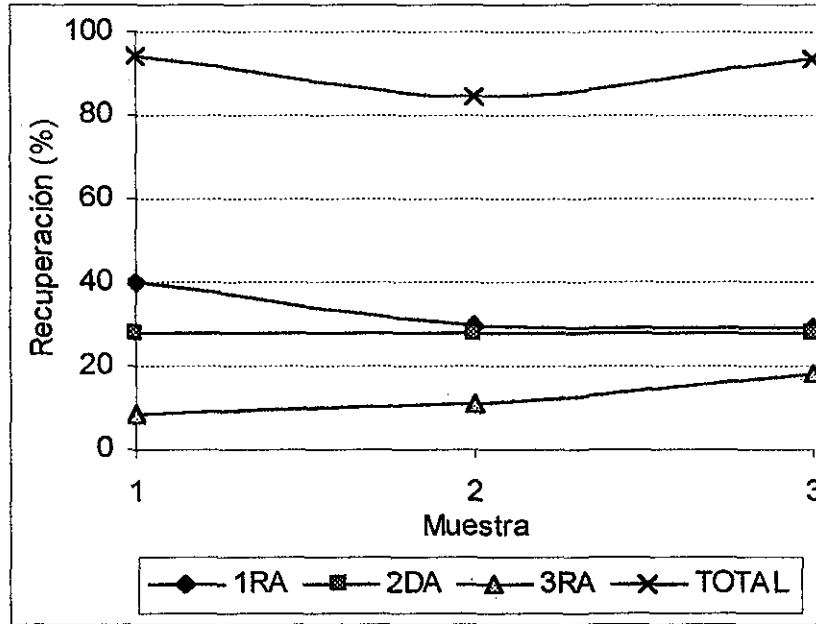
Una vez encontrado que la inestabilidad del fluoreno es la causa de la poca reproducibilidad en las extracciones con la celda de extracción en flujo, se procedió a cambiar de PAH. Se trabajó con pireno, ya que se demostró que este es un PAH estable y no se volatiliza a través del tiempo. Se siguió trabajando con el método de fortificación en reposo ya que es más rápido

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.5 EXTRACCIONES EN MUESTRAS FORTIFICADAS CON PIRENO.

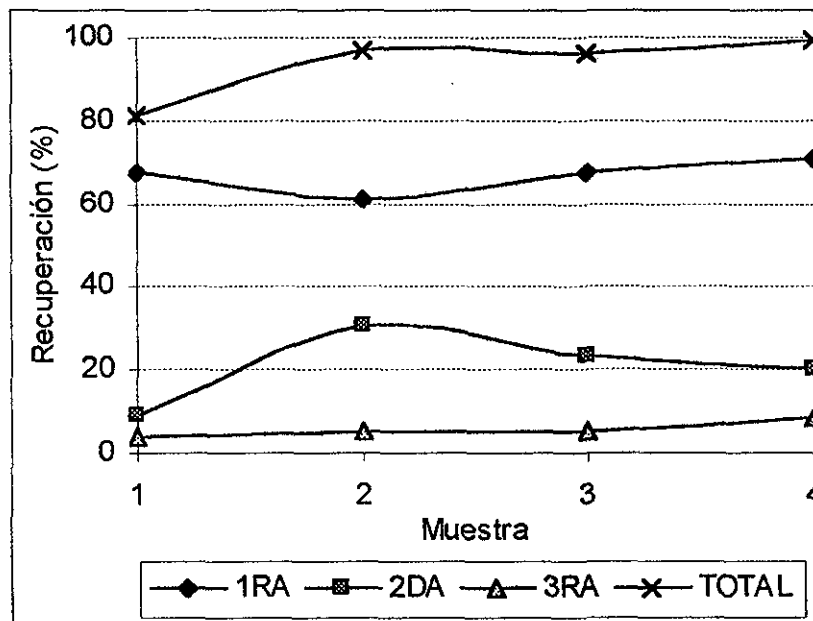
Se hizo un estudio para pireno, similar al que se hizo para fluoreno. El objetivo de este estudio fue eliminar el factor de inestabilidad del fluoreno a través del tiempo ya que contribuye de manera significativa en la reproducibilidad de las extracciones. Al ser el pireno una especie estable a través del tiempo, como ya quedó demostrado, se podrá conocer la reproducibilidad del sistema de extracción con la celda de extracción en flujo.

El estudio se hizo con hexano y agua como disolventes extractantes. Para el caso del hexano se trabajó con muestras fortificadas del modo convencional (Método 6, ver sección 2.3) y en la celda de extracción; es decir, en el modo convencional las muestras se fortificaron en vasos de precipitados, mientras que en la celda de extracción las muestras se fortificaron directamente en la misma. Esto se hizo para conocer si había alguna diferencia en las recuperaciones y en la reproducibilidad con ambas formas de fortificar. Las composiciones a las que se fortificaron las muestras fueron de 65.6 mg/Kg de tierras, mientras que la potencia de trabajo fue de 20%. Se utilizaron las mismas cantidades de muestra y disolventes que con fluoreno, en la fortificación y en la extracción. Los resultados de las extracciones realizadas con hexano se muestran en las Gráficas 23 y 24. El método de extracción que se utilizó fue el Método 4 (descrito en la sección 2.4), el cual se lleva a cabo en la celda de extracción.



Gráfica 23. Recuperaciones de pireno en muestras fortificadas en vasos de precipitados a 65.6 mg/Kg de tierras. Las tres extracciones sucesivas (1RA, 2DA y 3RA) se hicieron a 20% de potencia durante 1 minuto, utilizándose hexano como disolvente extractante. Promedio = 93.4, Desv. est. = 8.5 y %RSD = 9.1.

Nota. El porcentaje promedio de los residuos adsorbidos en los vasos para las tres muestras corresponde al 17.8% del total de pireno.



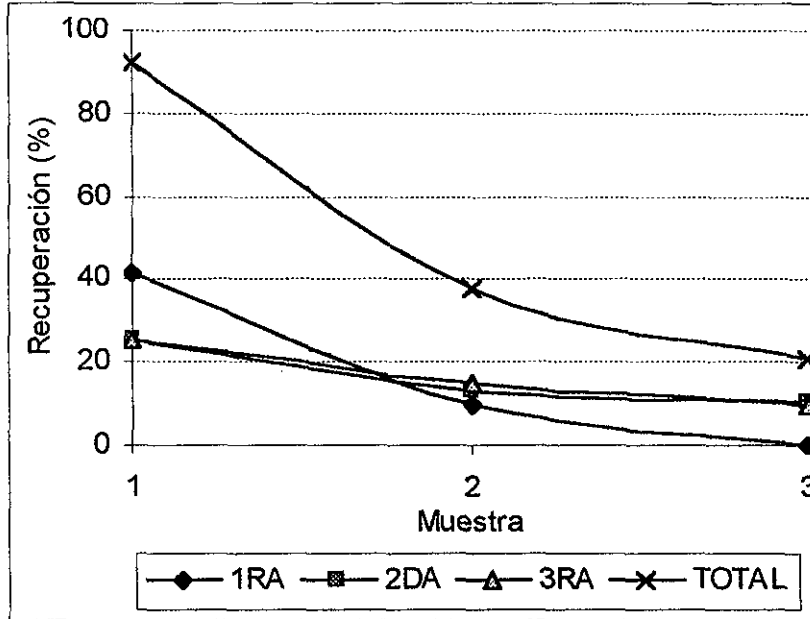
Gráfica 24. Recuperaciones de pireno en muestras fortificadas en la celda de extracción a 65.6 mg/Kg de tierras. Las tres extracciones sucesivas (1RA, 2DA y 3RA) se hicieron a 20% de potencia durante 1 minuto, utilizándose hexano como disolvente extractante. Promedio = 90.8 Desv. est. = 5.2 y %RSD = 5.7.

Los resultados de las extracciones hechas con hexano fortificando las muestras en vasos de precipitados y en la celda de extracción no muestran una diferencia significativa en las recuperaciones. Además, ya se puede observar una mejoría en lo que se refiere a reproducibilidad en comparación a las extracciones realizadas con fluoreno.

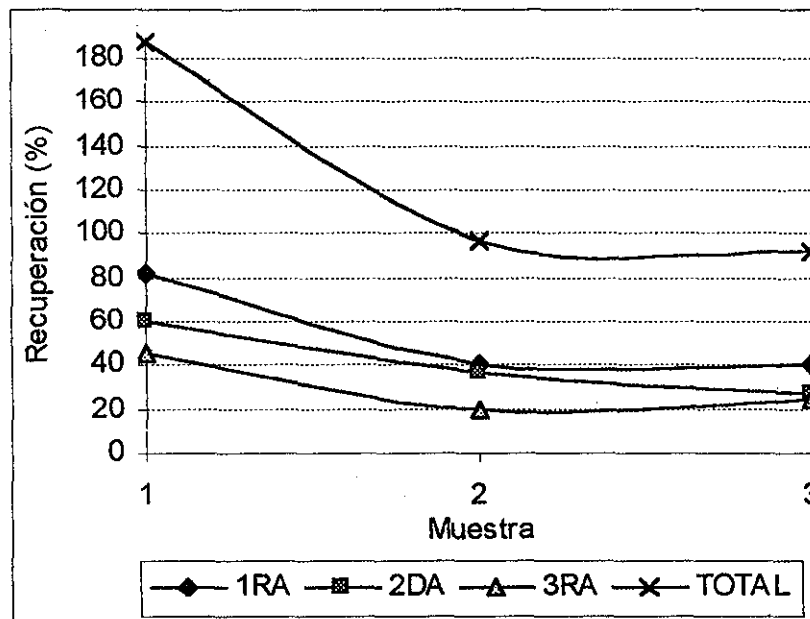
La Gráficas 23 y 24 muestran buenas recuperaciones para pireno, con un promedio cercano al 92 %, que las obtenidas con fluoreno, ver Gráfica 12, donde el promedio es del 25.2%, ambas extraídas bajo las mismas condiciones de extracción: potencia del 20%, hexano como disolvente extractante y muestras fortificadas con el PAH a 60 mg/Kg de tierras. Esta diferencia se debe a la inestabilidad del fluoreno, ya que éste se volatiliza; mientras que el pireno al ser un PAH estable se recupera en mayor proporción, siendo las diferencias debido al proceso de extracción. Cabe mencionar que en la Gráfica 23, se contabiliza en la recuperación total, el porcentaje de pireno que permanece adsorbido en las paredes de los vaso de precipitados en donde se fortificaron las muestras, que corresponde aproximadamente al 18 % del total de pireno. Para contabilizar el pireno adsorbido, se redisolvió éste con porciones de hexano, y se cuantificó la cantidad encoantrada.

Una vez eliminado el factor de inestabilidad a través del tiempo, se consiguieron resultados de reproducibilidad aceptables con un porcentaje de RSD menor al 10% para pireno, en contraste con muestras fortificadas con fluoreno donde los porcentos de RSD fueron mayores al 25%.

En las Gráficas 25 y 26 se muestran los resultados de las extracciones realizadas con agua como disolvente extractante. Las muestras se fortificaron a 0.94 mg/Kg de tierras. La razón de trabajar a esta composición se debió a la baja solubilidad de pireno en agua. Las potencias de trabajo fueron de 20 y de 50 %.



Gráfica 25. Recuperaciones de pireno en muestras fortificadas en reposo a 0.94 mg/Kg de tierras. Las tres extracciones sucesivas (1RA, 2DA y 3RA) se hicieron a 20% de potencia durante 1 minuto, utilizándose agua como disolvente extractante. Promedio = 50.3, Desv. est. = 37.6 y %RSD = 74.7.



Gráfica 26. Recuperaciones de pireno en muestras fortificadas en reposo a 0.94 mg/Kg de tierras. Las tres extracciones sucesivas (1RA, 2DA y 3RA) se hicieron a 50% de potencia durante 1 minuto, utilizándose agua como disolvente extractante. Promedio = 125.2, Desv. est. = 53.8 y %RSD = 43.0.

El mayor problema que se encontró al hacer extracciones de muestras fortificadas con pireno utilizando agua como disolvente extractante fue la solubilidad tan baja del pireno en este disolvente, 0.123 mg/L. De aquí que se trabajara con muestras fortificadas a 0.094 mg/Kg de tierras. El hecho de tener que disminuir la cantidad de pireno para fortificar las muestras repercute severamente en las medidas de absorbancia para la cuantificación ya que se mueve la línea base de los espectros de absorción debido a problemas de solubilidad y a que se está trabajando en los límites de detección del método de cuantificación, teniéndose que hacer las medidas por diferencia entre un máximo y un mínimo, dando medidas en el orden de la tercera cifra decimal de la absorbancia, de ahí los %RSD tan grandes obtenidos con agua.

Aun con el problema de irreproducibilidad con muestras fortificadas a concentraciones bajas de pireno se puede observar en las Gráficas 25 y 26 el poder del agua como disolvente extractante. En éstas se observa claramente como la recuperación se incrementa al aumentar la potencia en el horno de microondas; sin embargo, debido a que se está trabajando a bajas concentraciones hay bastante variabilidad en las recuperaciones, inclusive pareciera que todavía hay problemas de solubilidad como se muestra en la Gráfica 26, donde la recuperación total para la muestra 1 da un valor de 187%, debido a que se tiene al pireno en suspensión.

CONCLUSIONES

- Con ninguno de los métodos de fortificación estudiados (Métodos 1 a 4) se obtuvieron resultados reproducibles en cuanto a homogeneidad en la composición. Lo anterior se pudo deber, en gran parte, a la inestabilidad del fluoreno. Para evitar problemas de homogeneidad se decidió fortificar las muestras con el método de fortificación en reposo (Método 6). En éste, toda la muestra se somete al proceso de extracción, ya que de esta manera deja de ser un factor si la muestra es o no homogénea. No obstante, la fortificación en rotavapor permite que el fluoreno se fije a las tierras más fuertemente.
- Con los parámetros de la extracción óptimos para las mezclas hexano:etanol (4:1) y acetona:hexano (1:1) se obtienen eficiencias de extracción comparables; aunque la segunda mezcla es la más utilizada en la literatura, se decidió utilizar la mezcla hexano:etanol (4:1) ya que es menos tóxica y además la acetona absorbe en un amplio intervalo de la región ultravioleta que se utiliza para la medición.
- Ninguno de los parámetros tales como: tiempo, potencia y composición de la mezcla extractante afectan la eficiencia de extracción; por lo que se trabajó con condiciones menos drásticas para la celda (potencia = 20 % y tiempo = 1 minuto).
- Con las extracciones obtenidas en la celda de extracción y el sistema soxhlet se obtienen recuperaciones muy similares; sin embargo, la celda de extracción presenta las siguientes ventajas sobre el soxhlet: reducción del tiempo de extracción de 6 hrs. a 3 minutos; disminución del volumen de disolvente extractante de 120 mL a 27 mL; ausencia de etapa de preconcentración; la posibilidad de utilizar agua como disolvente extractante; y la reducción en la manipulación de la muestra y el disolvente extractante.

- El fluoreno es un PAH inestable, a través del tiempo, lo cual se refleja en la irreproducibilidad obtenida en las recuperaciones (%RSD = 30 %), además de ser estas últimas muy bajas, alrededor de 40 %. Se cambió al fluoreno por el pireno, por ser un PAH estable, obteniéndose recuperaciones mayores al 90% con un %RSD menor al 10%.

- Se demostró que el agua puede ser un buen disolvente extractante, para el caso de fluoreno, ya que se obtuvieron recuperaciones comparables con el método soxhlet. No obstante, se debe tener el cuidado de mantenerse siempre al PAH por debajo del nivel de solubilidad para no cometer errores en la cuantificación.

- Esta celda permitirá en estudios posteriores conectar la celda a un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA). De esta manera se podrá controlar el volumen de disolvente para llenar la celda, así como el vaciado. Otra opción después de sacar el disolvente de la celda será que éste pueda pasar por un cartucho de extracción en fase sólida para preconcentrar los PAH's y desadsorberlos posteriormente con una cantidad menor de disolvente. Una vez que los PAH's se hayan retenido en el cartucho de extracción, se podrá regresar el disolvente a la celda y realizar más reextracciones. Lo anterior siempre y cuando se utilice agua como disolvente extractante.

Anexo

VENTAJAS DE LA CELDA DE EXTRACCIÓN

La celda de extracción en flujo propuesta tiene las siguientes ventajas sobre los sistemas existentes de extracción:

- 1.- La celda es de teflón, lo cual confiere a la misma una gran resistencia química para la mayoría de disolventes orgánicos utilizados en los métodos de extracción. Inclusive, esta resistencia química de la celda puede ser aprovechada para hacer digestiones ácidas en la cuantificación de metales. El único sistema de extracción que aprovecha esta ventaja es la extracción en horno de microondas ya que el teflón por ser un material que no absorbe las ondas de microondas, permite la interacción de éstas con la muestra. A manera de ejemplo, se menciona en la literatura⁶⁰ que uno de los mayores problemas para utilizar al agua como disolvente extractante de compuestos orgánicos en recipientes de acero, lo cual se logra a altas temperaturas, es el poder de corrosión tan grande del agua a altas temperaturas sobre los metales. De aquí que quede prohibido el uso de agua en la Extracción con Fluidos Supercríticos, ya que la mayor parte del sistema está construido de acero.
- 2.- El compartimiento en la celda para la muestra tiene una capacidad de 13.7 cm³, por lo que requiere de poca cantidad de disolvente extractante para llenar la misma. De hecho se puede utilizar algún tipo de material inerte como relleno para reducir todavía más el espacio de la celda. En este trabajo se utilizaron esferas de vidrio (4 mm de diámetro) como relleno. La técnica convencional de extracción por soxhlet gasta entre 100 y 200 ml de disolvente. La técnica con horno de microondas gasta alrededor de 50 mL, cantidad que evidentemente disminuye en comparación al soxhlet; sin embargo, en ambas técnicas se tiene que llevar a cabo una etapa de preconcentración evaporando el disolvente a un volumen mínimo entre 10 mL y 1 mL. Para el caso de la celda de flujo

de extracción no es necesaria la etapa de preconcentrado ya que el volumen de disolvente que se utiliza para la mayoría de las extracciones es de 9 mL.

3.- Temperaturas y presiones dentro de la celda superiores a la presión atmosférica. En extracción con horno de microondas se ha probado que a presiones y temperaturas altas se obtienen mejores rendimientos de recuperación de compuestos orgánicos en un menor tiempo. Esta celda puede cerrarse herméticamente y calentarla con las microondas con lo cual se alcanzan temperaturas mayores a las del punto de ebullición a presión atmosférica.

4.- Tiempos cortos de extracción. Los métodos de extracción por horno de microondas generalmente requieren menos de 30 minutos para realizar la extracción de manera eficiente. En el caso del método estándar, soxhlet, los tiempos de extracción van de 6 a 24 hrs. Es evidente que esta disminución de tiempo permite procesar mayor cantidad de muestras por día. También si se requiere conocer el resultado rápidamente, la extracción con horno de microondas es una excelente opción.

5.- Disponibilidad de trasladar el sistema de extracción al sitio de muestreo. Hay ocasiones en las que es necesario saber si un suelo está contaminado o no con PAH's o algún otro contaminante orgánico para posteriormente tomar las decisiones pertinentes al momento de visitar el sitio contaminado. Para ello se puede trasladar al sitio de muestreo, el horno de microondas y la celda de flujo de extracción, cuyo peso aproximado es de unos 10 Kgs.. Además de llevar algún espectrofotómetro de UV para la determinación.

REFERENCIAS

- 1.- Abelson P. H., *Science* **1988**, 241, 1569.
- 2.- Wild S. R., Jones K. C., *Environ. Pollution* **1995**, 88, 91.
- 3.- Wilson and Jones, *Environ. Pollution* **1993**, 81, 229.
- 4.- Means J. C., Wood S. G., Hasset J. J. and Banwart W. L., *Environ. Sci. Technol.* **1980**, 14, 1524.
- 5.- Simpson C. D., Mosi A. A., Cullen W. R. and Reimer K. J., *Sci. Total Environ.* **1996**, 181, 265.
- 6.- Wild S. R. and Jones K. C., *Environ. Pollution* **1995**, 88, 91.
- 7.- Law R. J. and Biscaya J. L., *Marine Pollution Bulletin* **1994**, 29, 235.
- 8.- Danuta Bodzek, Beata Janoszka, Cezary Dobsz, Lidia Warzecha, Michael Bodzek, *J. Chromatogr. A* **1997**, 774, 177.
- 9.- Santodonato J.; Howard P.; Basu D. J., *Environ. Pathol. Toxicol.* **1981**, 5, 1.
- 10.- Rogge W. F., Hildemann L. M., Mazurek M. A., Cass G. R., *Environ. Sci. Technol.* **1993**, 27, 636.
- 11.- Milton L. Lee, Milos V. Novotny and Keith B. Bartle, *Analytical Chemistry of Polycyclic Aromatic Compounds*, Academic Press, USA 1981.
- 12.- Sabrina Moret, Lanfranco S. Conte, *J. Chromatogr. A* **2000**, 882, 245.
- 13.- Kosian P. A., Makynen E. A., Monson P. D., Mount D. R., Spacie A., Mekenyan O. G., Ankley G. T., *Environ. Toxicol. Chem.* **1998**, 17, 1021.
- 14.- Helmig D., Arey J., Atkinson R., Harger W. P., McElroy P. A., *Atmos. Environ.* **1992**, 26, 1735.
- 15.- Ligocki M. P., Leuenberger C., Pankow J. F., *Atmos. Environ.* **1985**, 19, 1609.
- 16.- Dickut R. M., Gustafson K. E., *Environ. Sci. Technol.* **1995**, 29, 1518.
- 17.- Lebo J. A., Smith L. M., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1986**, 69, 944.
- 18.- Wagrowski D. M., Hiles R. A., *Environ. Sci. Technol.* **1997**, 31, 279.
- 19.- Barbas J. T, Sigman M. E., Arce R., Dabestani R., *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1997**, 109, 229.
- 20.- Behymer T. D., Hites R. A., *Environ. Sci. Technol.* **1985**, 19, 1004.

- 21.- Yamasaki, *Environ. Sci. Technol.* **1982**, 16, 189.
- 22.- Barbas J. T., Sigman M. E., Dabestani R., *Environ. Sci. Technol.* **1996**, 30, 1776.
- 23.- W. S. Schutt W. S., Sigman M. E., Li Y., *Anal. Chim. Acta* **1996**, 319, 369.
- 24.- Zeng Y., Andrew Hung P. K., Wavrek D. A., *Wat. Res.* **2000**, 34, 1157.
- 25.- Zhou J. L., Fileman T. M., Evans S., Donkin P., Llewellyn C., Readman J. W., Mantoura R. F., Rowland S. J., *Marine Pollution Bulletin* **1998**, 36, 587.
- 26.- Laor Y., Strom P. F., Farmer W. J., *Wat. Res.* **1999**, 33, 1719.
- 27.- Kubat P., Civis S., Muck A., Barek J., Zima J., *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2000**, 132, 33.
- 28.- Zaidi B. R., Imam S. H., *Marine Pollution Bulletin* **1999**, 38, 733.
- 29.- Leppanen M. T., Kukkonen J. V., *Aquat. Toxicol.* **2000**, 49, 227.
- 30.- Zakrewski S. F., *Principles of Environmental Toxicology*, ACS Professional Reference Book, American Chemical Society, 1991.
- 31.- Schneider J., Grasser R., Jayasimhulu K., Xue W., Warshawsky D., *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 13, 13.
- 32.- Garcia-Ayuso L. E., Sánchez M., Fernández de Alba A., Luque de Castro M. D., *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2426.
- 33.- Luque de Castro M. D., Jiménez-Carmona M. M., *Trends Anal. Chem.* **2000**, 19, 223.
- 34.- Burford M. D., Hawthorne S. B., Miller D. J., *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1497.
- 35.- Sparr C. E., Bjorklund E., *J. Chromatogr. A* **2000**, 902, 227.
- 36.- Lopez-Avila V., Benedicto J., *Trends Anal. Chem.* **1996**, 15, 334.
- 37.- Dean J. R., Xiang G., *Trends Anal. Chem.* **2000**, 19, 553.
- 38.- Burguera M., Burguera J. L., *Anal. Chim. Acta* **1998**, 366, 63.
- 39.- Richter B. E., Jones B. A., Ezzell J. L., Porter N. L., *Anal. Chem.* **1996**, 68, 1033.
- 40.- Bjorklund E., Nilson T., *Trends Anal. Chem.* **2000**, 19, 434.
- 41.- Camel V., *Trends Anal. Chem.* **2000**, 19, 229.
- 42.- Bryce D. W., Izquierdo A., Luque de Castro M. D., *Anal. Chim. Acta* **1996**, 324, 69.
- 43.- Bryce D. W., Izquierdo A., Luque de Castro M. D., *Analyst* **1995**, 120, 2171.
- 44.- Torres P., Ballesteros E., Luque de Castro M. D., *Anal. Chim. Acta* **1995**, 308, 371.
- 45.- Ganzler K., Salgó A., Valkó K., *J. Chromatogr.* **1986**, 371, 299.
- 46.- Ericsson M., Colmsjö A., *J. Chromatogr. A* **2000**, 877, 141.

- 47.- Tomaniová M., Hajslová J., Pavelk Jr. J., Kocourek V., Holadová K., Klímová I., *J. Chromatogr. A* **1998**, 827, 21.
- 48.- Pastor A., Vázquez E., Ciscar R., De la Guardia M., *Anal. Chim. Acta* **1997**, 344, 241.
- 49.- Saim N, Dean J. R., Pauzi M. A., Zakaria Z., *J. Chromatogr. A* **1997**, 791, 361.
- 50.- Dupeyron S., Dudermel P. M., Couturier D., *Analisis* **1997**, 25, 286.
- 51.- Chee K. K., Wong M. K., Lee H. K., *J. Chromatogr. A* **1996**, 723, 259.
- 52.- Barnabas I. J., Dean J. R., Fowles I. A., Owen S. P., *Analyst* **1995**, 120, 1897.
- 53.- Lopez-Avila V., Young R., Benedicto J., Ho P., Kim R., *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2096.
- 54.- Lopez-Avila V., Young R., Beckert W. F., *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1097.
- 55.- Budzinski H., Letellier M., Garrigues P., Menach K., *J. Chromatogr. A* **1999**, 837, 187.
- 56.- Valcárcel M., Luque de Castro M. D., *Analyst* **1990**, 115, 699.
- 57.- Cuesta A., Todoti J. L., Canals A., *Spectrochim. Acta* **1996**, 51B, 1791.
- 58.- Mangani F., Cappiello A., Crescentini G., Bruner F., Bonfanti L., *Anal. Chem.* **1987**, 59, 2066.
- 59.- Tena M. T., Luque de Castro M. D., Valcárcel M., *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2386.
- 60.- Luque de Castro M. D., Jiménez-Carmona M. M., *Trends Anal. Chem.* **1998**, 17, 441.
- 61.- Sonneveld C., *Commun. Soil Sci. Plant. Anal.* **1990**, 21, 1257.
- 62.- Santing S. J., Taylor R. P., *Ann. Clin. Biochem.* **1992**, 29, 668.
- 63.- Beljaars P. R., Dijk R., Bisschop E., Spiegelberg W. M., *J. AOAC Int.* **1996**, 79, 697.
- 64.- Stout S. J., DaCunha A. R., Allardice D. G., *Anal. Chem.* **1996**, 68, 653.
- 65.- Bou-Raad M., *personal communication*.
- 66.- Chen D., Lázaro F., Luque de Castro M. D., Valcárcel M., *Anal. Chim. Acta* **1989**, 226, 221.
- 67.- Lázaro F., Luque de Castro M. D., Valcárcel M., *Anal. Chim. Acta* **1991**, 242, 283.
- 68.- Hawthorne S. B., Yang Y., Miller D. J., *Anal. Chem.* **1994**, 66, 2912.