



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS
PARA LA DETERMINACIÓN DE HAPs Y SUS METABOLITOS EN
FLUIDOS BIOLÓGICOS**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. CITLALLI DOMÍNGUEZ GUTIÉRREZ



TUTOR: FRANCISCO ROJO CALLEJAS AÑO 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 102 del Departamento de Química Analítica, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo fueron presentados en el XXII Congreso Nacional de Química Analítica celebrado del 23 al 27 de junio de 2008 en Mérida Yucatán, México.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación académica que me ha dado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la estancia en el programa de Maestría en Ciencias Químicas en el periodo 2006/2 – 2008/2

A Humberto Gómez Ruiz por sus consejos y orientación.

A Lucia Hernández por su amistad y apoyo incondicional.

A los miembros del jurado por sus importantes comentarios y sugerencias

ÍNDICE

Agradecimientos.....	i
Abreviaturas.....	ii
Resumen.....	1
Capítulo 1. Introducción.....	3
Capítulo 2. Objetivos.....	6
2.1 Objetivo General.....	6
2.2 Objetivos Particulares.....	6
Capítulo 3. Antecedentes.....	7
3.1 Estructura Química de los HAPs.....	7
3.2 Propiedades fisicoquímicas de los HAPs.....	7
3.3 Reactividad de los HAPs.....	10
3.4 Fuentes de exposición a HAPs.....	11
3.5 HAPs-Efectos sobre la salud.....	12
3.6 Biotransformación de los HAPs.....	13
3.7 Marcadores biológicos de exposición.....	15
3.8 Límites de exposición a HAPs.....	17
3.9 Usos de algunos HAPs.....	17
3.10 Métodos analíticos para la determinación de HAPs.....	18
3.11 Técnicas de preparación de muestras para la determinación de HAPs...	20
3.11.1 Extracción Líquido-Líquido.....	20
3.11.2 Extracción en Fase Sólida.....	21
Capítulo 4. Desarrollo Experimental.....	25
4.1 Instrumentación.....	25
4.2 Equipo y Material.....	25
4.3 Reactivos y Muestras.....	26
4.4 Preparación de disoluciones.....	27
4.5 Preparación de muestra.....	29
4.5.1 Toma de muestra.....	29

4.5.2 Tratamiento por extracción en fase sólida.....	29
4.6 Optimización de las condiciones instrumentales para la separación por CLAR de 16 HAPs y 5 metabolitos hidroxilados.....	30
4.7 Evaluación de parámetros cromatográficos.....	31
4.8 Optimización de las condiciones de extracción en fase sólida de los metabolitos en muestras de orina.....	32
4.9 Evaluación de parámetros de validación.....	33
4.9.1 Linealidad.....	33
4.9.2 Especificidad.....	34
4.9.3 Precisión.....	35
4.9.4 Límites de detección y cuantificación.....	36
4.10 Evaluación de interferencias de HAPs en la determinación de hidroxi-HAPs.....	37
Capítulo 5. Resultados.....	38
5.1 Optimización de las condiciones instrumentales.....	38
5.2 Evaluación de parámetros cromatográficos.....	45
5.3 Optimización de las condiciones de extracción en fase sólida de los metabolitos en muestras de orina.....	48
5.4 Evaluación de parámetros de validación.....	51
5.4.1 Linealidad.....	51
5.4.2 Especificidad.....	66
5.4.3 Precisión.....	66
5.4.4 Límites de detección y cuantificación.....	68
5.5 Evaluación de interferencias de HAPs en la determinación de hidroxi-HAPs.....	73
Capítulo 6. Conclusiones.....	74
Bibliografía.....	75
Apéndices	

RESUMEN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son un grupo de más de 200 sustancias químicas diferentes que se forman durante la combustión incompleta del carbón, petróleo y gasolina, basura y otras sustancias orgánicas como tabaco y carne preparada en la parrilla. La presencia de estos compuestos en el ambiente genera diversos daños a la salud de las personas expuestas.

El Departamento de Salud y Servicios Humanos (DHHS) de los Estados Unidos ha determinado que es razonable predecir que algunos HAPs son carcinogénicos.

En México, la industria ladrillera sigue empleando para la manufactura de sus productos, combustibles altamente contaminantes como llantas, aceites gastados, residuos industriales y casi cualquier material orgánico de desecho, por lo tanto la gente que labora en este tipo de industrias están expuestos por largos periodos de tiempo a la presencia de HAPs. De aquí el interés por estudiar los efectos que sobre la salud podrían causar los más de 250 hornos ladrilleros que se encuentran en la población de San Nicolás, municipio de Tequisquiapan, Qro, la cual cuenta con alrededor de 4,000 habitantes, de los cuales una gran parte se dedica a la fabricación del ladrillo.

La presente tesis comprende, la implementación de un método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) con detectores ultravioleta visible (UV-VIS) y fluorescencia (FL) para la determinación de 16 HAPs y 5 metabolitos monohidroxilados de naftaleno, acenafteno, fenantreno y pireno en muestras de orina fortificadas de personas no expuestas laboralmente a HAPs, utilizando la técnica de extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) en la preparación de las muestras. Cabe mencionar que el método es aplicable al análisis de muestras de orina de personas altamente expuestas a HAPs como lo es la población de San Nicolás, Qro.

Primeramente se llevó a cabo la optimización de las condiciones cromatográficas como son: composición de fase móvil, gradiente de elución, tipo de fase estacionaria, flujo, temperatura de columna y longitudes de onda de absorción, excitación y emisión, para la separación de los 16 HAPs y los 5 metabolitos monohidroxilados separadamente; con las condiciones óptimas encontradas se evaluó la linealidad, precisión, especificidad, límite de detección y límite de cuantificación del sistema para los

compuestos estudiados. Posteriormente se trataron muestras de orina de personas voluntarias que no se encontraban expuestas a HAPs. Las muestras se fortificaron con una mezcla de los 5 metabolitos monohidroxilados y se sometieron a extracción en fase sólida, evaluando la cantidad de metabolitos recuperados después del proceso de extracción en fase sólida. Una vez optimizadas las condiciones de extracción se llevó a cabo nuevamente la evaluación de linealidad, precisión, especificidad, límite de detección y límite de cuantificación ahora en muestras de orina.

Finalmente se evaluó la posible interferencia de los HAPs en la determinación de metabolitos en muestras de orina, considerando que en muestras de personas que se encuentran altamente expuestas a HAPs habría la presencia de ambos grupos de compuestos. Para la evaluación se inyectó en las condiciones óptimas de separación de hidroxi-HAPs una mezcla de 16 HAPs y 5 metabolitos monohidroxilados en orina, tratada por extracción en fase sólida.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) consisten en más de 200 compuestos químicos formados por dos o más anillos aromáticos unidos en arreglos angulares, lineales o agrupados (Xu *et al.* 2004, Johsen *et al.* 2005).

Los HAPs pueden clasificarse en dos grupos con propiedades y efectos diferentes: los de bajo peso molecular, con dos y tres anillos aromáticos, son menos hidrofóbicos y presentan una alta toxicidad; los de alto peso molecular con cuatro o más anillos aromáticos son fuertemente hidrofóbicos y potencialmente mutagénicos y carcinógenos (Bouzige *et al.* 1998, Vera *et al.* 2002).

Los HAPs se encuentran en el ambiente generalmente como una mezcla de varios de estos compuestos producidos por la combustión incompleta de materia orgánica a temperaturas que superan los 800°C. La composición de los productos de la combustión depende del combustible, la temperatura y el tiempo de permanencia a altas temperaturas. Debido a sus bajas presiones de vapor, la mayoría de los HAPs se condensan sobre partículas de hollín o forman ellos mismos partículas muy pequeñas. Los HAPs liberados a la atmósfera en forma de vapor son adsorbidos por las partículas presentes en ella, produciendo una diseminación de aerosoles que contiene HAPs y que puede ser transportada a grandes distancias por los vientos (Stellman 2001, Kuusimäki *et al.* 2004, Li *et al.* 2006).

Estos compuestos penetran en el cuerpo humano a través de las vías respiratoria, gastrointestinal y dérmica, llegando esta última en algunos casos a alcanzar el 70% de la cantidad absorbida. Una vez en el interior del organismo, el hígado es el sitio primario de biotransformación sin importar la vía de entrada, debido a que este órgano contiene enzimas necesarias para transformar los HAPs en otros compuestos más fácilmente eliminables en orina, entre los que destacan los monohidroxi y dihidroxi derivados (Van Rooij *et al.* 1993, Ellenhorn 1997, Jongeneelen 1997, Elovaara *et al.* 2003, Xu *et al.* 2004, Li *et al.* 2006).

Los HAPs y sus derivados están asociados a diversos tipos de cáncer en el hombre. Dadas las diferentes fuentes de estos compuestos y el hecho de que algunos grupos

poblacionales que residen o trabajan en ambientes directamente influenciados por estas fuentes están sometidos a un riesgo mayor, se hace necesario el monitoreo biológico de exposición a estos compuestos que se puede realizar mediante la determinación de la concentración de sus metabolitos en fluidos biológicos (sangre u orina) (www.who.int/ipcs/en).

La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) y la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos (U.S. EPA, por sus siglas en inglés) han clasificado a varios HAPs como posibles carcinógenos humanos. Existen evidencias de que algunos compuestos de esta familia aumentan el efecto carcinogénico de otros HAPs, como por ejemplo el pireno, que potencia el efecto del benzo[a]pireno. El benzo[a]pireno es uno de los HAPs que posee la capacidad de desarrollar efectos carcinogénicos, genotóxicos y/o mutagénicos y se encuentra presente en la mayoría de las fuentes de producción de estos compuestos. Lo anterior, aunado al tiempo de permanencia en el medio ambiente, hacen que este compuesto sea empleado como elemento de referencia en diferentes estudios ambientales (Van Rooij *et al.* 1993, Baumard *et al.* 1997, Kuusimäki *et al.* 2004, Schedl *et al.* 2001, <http://monographs.iarc.fr>)

Siendo el pireno un hidrocarburo común en la mayor parte de las mezclas de HAPs, su metabolito principal, el 1-hidroxipireno es el más usado como indicador biológico de los HAPs ya que tiene la ventaja de no estar influenciado por el consumo de tabaco (Jongeneelen *et al.* 1986, Jongeneelen *et al.* 1988, Elovaara *et al.* 2003, Xu *et al.* 2004, Kuusimäki *et al.* 2004, Zheng Li *et al.* 2006, Romanoff *et al.* 2006, Maissonette *et al.* 2006, Wegener *et al.* 2006, Jacob *et al.* 2007).

Se han utilizado diversos métodos para la determinación de HAPs, tales como métodos espectrofotométricos, métodos de inmunoensayo (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA, UltraSensitive Enzymatic RadioImmunoAssay, USERIA) y métodos cromatográficos (Gas Chromatography/Mass Spectrometry, GC/MS, High Performance Liquid Chromatography, HPLC) (Jongeneelen 1997, Kousmanenen *et al.* 2003, Pensado *et al.* 2005, Filipkowska *et al.* 2005, Díaz *et al.* 2007, Zuazagoitia *et al.* 2007).

Tomando en cuenta que un alto porcentaje de las poblaciones en México cocina con leña y por lo tanto están expuestos por largos periodos de tiempo a la presencia de HAPs; y en algunas zonas del país como es el caso de San Nicolás, municipio de

Tequisquiapan, Qro., en donde se ubican aproximadamente 250 ladrilleras las cuales utilizan diversos combustibles como aceites gastados, llantas y residuos industriales para la fabricación del ladrillo, es que se decidió establecer un método de análisis para determinar la presencia de los metabolitos de estos compuestos en orina.

La presente tesis comprende, la implementación de un método por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detectores ultravioleta visible (UV-VIS) y fluorescencia (FL) para la determinación de 16 HAPs entre los que se encuentran 14 HAPs considerados por la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos (U.S. EPA, por sus siglas en inglés) en sus listas de contaminantes prioritarios y 5 metabolitos monohidroxilados de naftaleno, acenafteno, fenantreno y pireno en muestras de orina fortificadas de personas no expuestas laboralmente a HAPs, utilizando la técnica de extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) en la preparación de muestra.

Primeramente se llevó a cabo la optimización de las condiciones cromatográficas como son: composición de fase móvil, gradiente de elución, tipo de fase estacionaria, flujo, temperatura de columna y longitudes de onda de absorción, excitación y emisión, para la separación de los 16 HAPs y los 5 metabolitos monohidroxilados separadamente; con las condiciones óptimas encontradas se evaluó la linealidad, precisión, especificidad, límite de detección y límite de cuantificación del sistema para los compuestos estudiados. Posteriormente se trataron muestras de orina de personas voluntarias que no se encontraban expuestas a HAPs. Las muestras se fortificaron con una mezcla de los 5 metabolitos monohidroxilados y se sometieron a extracción en fase sólida, evaluando la cantidad de metabolitos recuperados después del proceso de extracción en fase sólida. Una vez optimizadas las condiciones de extracción se llevó a cabo nuevamente la evaluación de linealidad, precisión, especificidad, límite de detección y límite de cuantificación ahora en muestras de orina.

Finalmente se evaluaron las interferencias que pudieran provocar los HAPs en la determinación de metabolitos en muestras de orina, considerando que en muestras de personas que se encuentran altamente expuestas a HAPs habría la presencia de ambos grupos de compuestos. Para la evaluación se inyectó en las condiciones óptimas de separación de hidroxi-HAPs una mezcla de 16 HAPs y 5 metabolitos monohidroxilados tratada por extracción en fase sólida.

CAPITULO 2

OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Implementar un método de análisis para la separación y determinación de metabolitos monohidroxiados de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en muestras de orina por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección ultravioleta visible – fluorescencia (CLAR-UV-FL), utilizando extracción en fase sólida (EFS) en la preparación de la muestra.

2.2 Objetivos Particulares

- Optimizar la separación de una mezcla de 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) por CLAR-UV-FL.
- Determinar los límites de detección y cuantificación instrumentales para cada uno de los 16 HAPs.
- Optimizar la separación de una mezcla de 5 metabolitos monohidroxiados de naftaleno, acenafteno, fenantreno y pireno por CLAR-UV- FL.
- Optimizar las condiciones de extracción en fase sólida para la recuperación de los metabolitos monohidroxiados en muestras de orina.
- Evaluar los parámetros de validación como son: linealidad, especificidad, precisión, límite de detección y límite de cuantificación del instrumento y del método para cada uno de los metabolitos estudiados.
- Evaluar las interferencias de HAPs en la determinación de los metabolitos en muestras de orina.

CAPÍTULO 3

ANTECEDENTES

3.1 Estructura Química de los HAPs

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) se componen de dos o más anillos bencénicos fusionados entre sí. Son clasificados como compuestos aromáticos debido a que son cíclicos, contienen $(4n + 2)$ electrones π y cada átomo de carbono en el anillo tiene hibridación sp^2 lo que hace posible la deslocalización de los electrones (Krewski *et al.* 1989).

La estructura condensada más sencilla formada por sólo dos anillos aromáticos es el naftaleno, su estructura y representación de orbitales se muestra en la figura 3.1 (<http://images.google.com>).

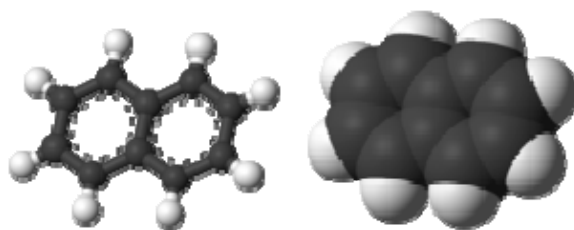


Figura 3.1.1. Representación de la molécula de Naftaleno.

Los HAPs pueden clasificarse en dos grupos con propiedades y efectos diferentes: los de bajo peso molecular, con dos y tres anillos aromáticos, son menos hidrofóbicos y presentan una alta toxicidad; los de alto peso molecular son fuertemente hidrofóbicos y potencialmente mutagénicos y carcinógenos (Vera *et al.* 2002).

3.2 Propiedades fisicoquímicas de los HAPs

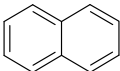
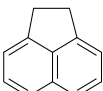
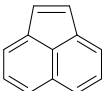
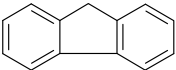
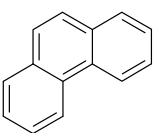
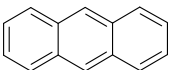
A temperatura ambiente los HAPs se encuentran en estado sólido. Las características comunes de estas sustancias son puntos de fusión y ebullición elevados, presión de vapor baja y solubilidad en agua muy baja, la cual disminuye al aumentar el peso molecular (*tabla 3.2.1*). Dependiendo de su carácter aromático los HAPs absorben luz ultravioleta y producen un espectro fluorescente característico (Stellman 2001).

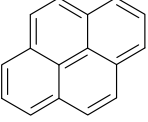
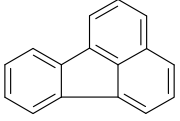
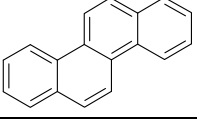
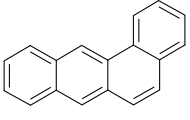
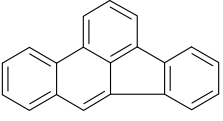
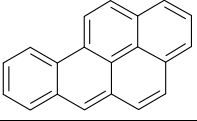
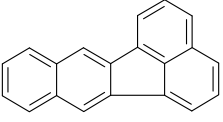
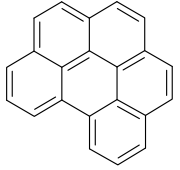
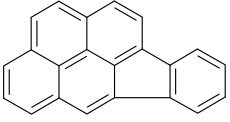
Son potencialmente bioacumulados y concentrados en sedimentos y suelos en función de su persistencia. Como regla general, la persistencia del compuesto aumenta al aumentar el tamaño de la molécula.

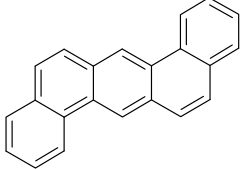
Los HAPs de bajo peso molecular son menos hidrofóbicos (coeficiente de reparto octanol-agua como $\log K_{ow}$ entre 3.3 y 5) y los de alto peso molecular son fuertemente hidrofóbicos con coeficientes de reparto octanol-agua mayores a 5.5 (*tabla 3.2.1*). Está comprobado que la toxicidad aumenta al aumentar el peso molecular y el carácter hidrofóbico (Bouzigue *et al.* 1998).

En la tabla 3.2.1 se presentan las propiedades fisicoquímicas de los 16 HAPs incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la EPA (Agencia de Protección al Ambiente de EUA) ordenados en orden decreciente de polaridad (Hodgeson 1990, Budavari 2001, www.mtas.es, www.atsdr.cdc.gov).

Tabla 3.2.1. Propiedades fisicoquímicas de los 16 HAPs de la lista de contaminantes prioritarios de la EPA.

<i>Compuesto/ Estructura</i>	<i>PM (g/mol)</i>	<i>p.f (°C)</i>	<i>p.eb (°C)</i>	<i>ρ (g/ml)</i>	<i>Sol. en agua (mg/L)</i>	<i>P_{vap} (Pa)</i>	<i>log K_{ow}</i>
Naftaleno 	128	80	218	1.16	NR	11	3.30
Acenafteno 	154	95	279	1.19	1.93	0.59	3.98
Acenaftileno 	152	78	280	0.90	3.93	3.86	4.07
Fluoreno 	166	116	295	1.20	1.98	0.04	4.18
Fenantreno 	178	99	336	1.06	1.2	0.09	4.45
Antraceno 	178	218	342	1.25	0.76	2.26×10^{-3}	4.45

Pireno 	202	156	404	1.27	0.077	3.33×10^{-4}	4.88
Fluoranteno 	202	107	384	1.25	0.26	6.66×10^{-4}	4.90
Criseno 	228	252	448	1.27	2.8×10^{-3}	8.4×10^{-5}	5.56
1,2-benzantraceno 	228	155	438	NR	0.01	2.93×10^{-6}	5.61
Benzo[b]fluoranteno 	252	168	NR	NR	0.0012	6.67×10^{-5}	6.04
Benzo[a]pireno 	252	179	310	1.40	2.3×10^{-3}	7.46×10^{-7}	6.05
Benzo[k]fluoranteno 	252	215	480	NR	7.6×10^{-4}	1.28×10^{-8}	6.06
Benzo[g,h,i]perileno 	276	273	550	---	2.6×10^{-4}	1.37×10^{-8}	6.50
Indeno[cd]pireno 	276	164	530	---	0.062	1.33×10^{-4}	6.58
1,2:5,6-dibenzantraceno 	278	267	524	1.28	5×10^{-4}	1.33×10^{-8}	6.84

							
---	--	--	--	--	--	--	--

PM: Peso molecular (g/mol)

p.f: Punto de fusión (°C)

p.eb: Punto de ebullición (°C)

ρ: Densidad (g/mL)

Sol: Máxima concentración de un compuesto capaz de disolverse en el agua (mg/L)

P_{vap}: Presión de vapor (Pa)

log K_{OW}: Logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua

NR: No reportado en la literatura

3.3 Reactividad de los HAPs

La principal reacción de los HAPs es la sustitución electrofílica aromática, sustituyendo uno de los hidrógenos del anillo por un grupo electrófilo en presencia de un catalizador y dando lugar a varios isómeros monosustituídos. En general la posición en la cual se lleva a cabo la sustitución puede ser controlada por las condiciones de reacción como son temperatura, disolvente de reacción o catalizador. Cuando se produce la saturación, se pueden llevar a cabo reacciones de adición conservándose el sistema de anillos. Las densas nubes de electrones π en ambos lados de las estructuras de los anillos les confiere alta resistencia al ataque nucleofílico y con ello alta estabilidad química (Wingrove 1981).

La mayoría de los HAPs sufren foto oxidación, siendo ésta una forma para eliminarlos de la atmósfera. La reacción de foto oxidación más frecuente es la formación de endoperóxidos, que pueden convertirse a quinonas. Los HAPs reaccionan rápidamente con óxidos de nitrógeno o HNO_3 . Por ejemplo, el antraceno puede oxidarse a antraquinona por acción del HNO_3 o dar un derivado nitrogenado mediante una reacción de sustitución con NO_2 . El hecho de que los HAPs considerados cancerígenos o no, reaccionen con otras sustancias no significa que se inactiven como tales, por el contrario, muchos de ellos se transforman en cancerígenos más potentes que el correspondiente compuesto progenitor. Por ejemplo, el benz[a]antraceno que está presente en el humo del cigarro es un carcinógeno débil pero algunos de sus derivados metilados y dimetilados son altamente carcinógenos (Mastrandrea *et al.* 2005).

3.4 Fuentes de exposición a HAPs

Los HAPs pueden hallarse casi en todas partes, en el aire, adheridos a partículas de polvo, en el suelo y el agua, procedentes de fuentes naturales o antropogénicas. La contribución de las fuentes naturales, como los incendios forestales y las emisiones volcánicas, es mínima comparada con las emisiones causadas por el ser humano. Los derrames de combustibles fósiles son la principal fuente de emisión de HAPs. Estos compuestos también están presentes en el humo del tabaco y en los alimentos preparados en la parrilla, ahumados y fritos (Kaserouni *et al.* 2001).

La producción de aluminio se realiza mediante un proceso electrolítico a temperaturas de 970 °C. Existen dos tipos de ánodos: el de Soderberg y el de grafito ("precocido"). El primero de ellos, que es el más empleado, está formado por una mezcla de coque y alquitrán de hulla y es la principal causa de exposición a los HAPs en la industria del aluminio. Los segundos se utilizan en las plantas de reducción de aluminio, en los hornos eléctricos de acero y en otros procesos metalúrgicos. La materia prima para la fabricación de estos electrodos suele ser coque de petróleo mezclado con alquitrán como ligante. El cocido de los mismos se realiza calentando esta mezcla a temperaturas superiores a los 1000 °C, proceso durante el cual se liberan grandes cantidades de HAPs (Stellman 2001).

Otra fuente importante es la utilización del asfalto para pavimentar calles y carreteras que procede principalmente de los residuos de destilación del petróleo crudo. El asfalto de petróleo contiene pocos HAPs. No obstante, en algunos casos este asfalto se mezcla con alquitrán de hulla, lo que aumenta el riesgo de exposición cuando se trabaja con el asfalto caliente. En otros trabajos donde se utiliza el alquitrán derretido como recubrimientos de grandes superficies (aislamiento de paredes, oleoductos, etc.), los trabajadores pueden sufrir una intensa exposición. Las fuentes de HAPs en el trabajo, además del alquitrán de hulla y el asfalto, son el negro de humo, la creosota, los aceites minerales (aceites lubricantes y aceites de corte), los humos y hollines procedentes de diferentes combustiones y las emisiones del escape de los automóviles (Stellman 2001, www.who.int/ipcs/en).

En México una de las fuentes importantes de exposición a HAPs son los hornos ladrilleros, un viejo problema ambiental, social y de salud. Tan solo en el área metropolitana de la Ciudad de México funcionan más de mil ladrilleras, con sistemas

tecnológicos obsoletos que causan serios problemas a quienes trabajan en ellas, así como a la población en general (DGESA 2002). En el estado de México hay más de 500 ladrilleras, ubicadas especialmente en Chalco, Ixtapaluca, Coyotepec, Huixquilucan, Acolman y Teotihuacán de donde obtienen sus ingresos unas 10 mil personas. Esta actividad origina al año más de dos mil toneladas de contaminantes, principalmente partículas suspendidas (CENICA 2002). Un caso particular es el que se presenta en la población de San Nicolás, municipio de Tequisquiapan, Oro., la cual cuenta con alrededor de 4,000 habitantes, de los cuales una gran parte se dedica a la fabricación del ladrillo. La importancia económica de dicha actividad puede estimarse bajo el conocimiento de que en este sitio se ubican aproximadamente 250 ladrilleras, las cuales operan sistemáticamente, sin algún tipo de control ambiental. Son los miembros de la familia incluyendo a los niños los que se dedican a las tareas de amasar el lodo, formar las compostas para armar los ladrillos y acarrear los materiales que se queman en los hornos, generalmente leña y aserrín, aunque a veces también llantas, aceites gastados, residuos industriales y casi cualquier material orgánico de desecho. La preparación de la pasta y el moldeo se realizan directamente sobre el suelo. El secado es natural, tardando según los ladrilleros hasta seis días. La cocción dura entre 48 y 72 horas.

3.5 HAPs-Efectos sobre la salud

No todos los HAPs han mostrado poseer efectos carcinogénicos, genotóxicos o mutagénicos (*tabla 3.5.1*) y muchas veces el efecto se atribuye a la presencia conjunta de más de un compuesto de la familia y de algunos de sus derivados, principalmente los nitroderivados.

Tabla 3.5.1. Datos relativos a los efectos carcinogénicos, genotóxicos y mutagénicos de algunos HAPs.

<i>Compuesto</i>	<i>Carcinogenicidad</i>	<i>Genotoxicidad</i>	<i>Mutagenicidad</i>
Fenantreno	I	L	+
Antraceno	N	N	-
Pireno	N	L	+
Benzo[a]antraceno	S	S	+
Benzo[e]pireno	I	L	+
Benzo[a]pireno	S	S	+

Dibenz[a]antraceno	S	S	+
Benzo[ghi]perileno	I	I	+
Dibenzopirenos	S	I	+

S = Suficiente, I = Insuficiente, N = No carcinogénico, L = Limitados

Mutagenicidad: +(positivo); -(negativo)

Los efectos tóxicos de algunos HAPs sobre la piel están asociados con dermatitis aguda y crónica con síntomas de quemazón, picor y edema, que son más pronunciados en las regiones de la piel expuesta. La exposición prolongada causa pigmentación en las zonas de la piel expuesta, con cornificación de las capas superficiales y telangiectasis. También se puede observar irritación de las vías aéreas superiores con bronquitis y tos crónica. En los ojos producen lagrimeo, fotofobia, edema de párpados e hiperemia conjuntival (Stellman 2001).

En humanos la vía respiratoria es considerada la más importante, particularmente para individuos altamente expuestos, de igual manera la vía dérmica puede ser tanto o más importante (Li *et al.* 2006).

Un esquema propuesto para la carcinogenicidad por exposición ambiental considera las siguientes etapas: exposición, activación metabólica, formación de aductos entre HAPs y ADN, mutaciones en genes críticos y sucesión de mutaciones en otros genes. Es importante recalcar que la aparición del cáncer es un proceso que involucra varias etapas, siendo también influenciado por susceptibilidad individual y otros factores, tales como la edad, sexo, etnia, estado de salud, nutrición y polimorfismo genético. En personas altamente expuestas se encuentra una mayor concentración de aductos HAP-ADN (Denissenko 1996, Krewski *et al.* 1989).

3.6 Biotransformación de los HAPs

La biotransformación de los HAPs involucra una serie de enzimas que catalizan reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis (enzimas del citocromo P 450-CYP) y de enzimas que catalizan reacciones de conjugación (sulfotransferasa, epóxido hidrolasa, glutation-S-transferasa y UDP-glicotransferasa). Estos sistemas enzimáticos están distribuidos en todos los tejidos del organismo (Shimada *et al.* 1996). En la figura 3.6.1 se representa la ruta metabólica del benzo[a]pireno.

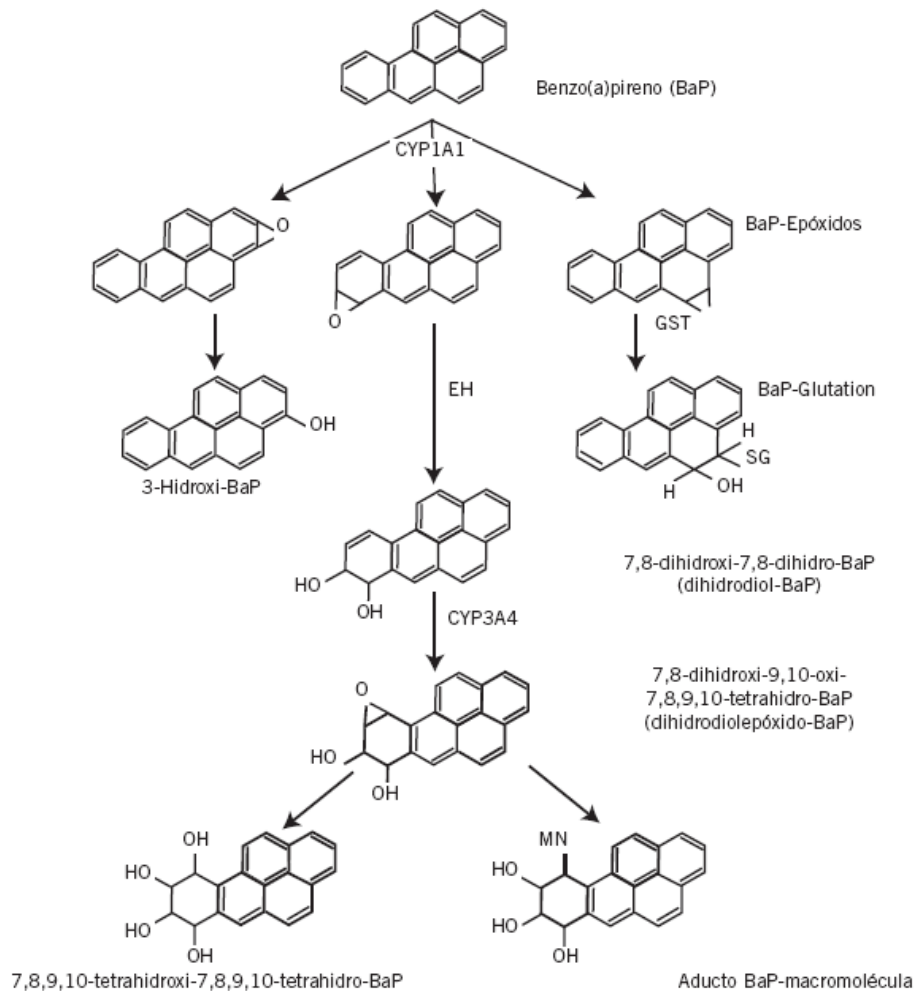


Figura 3.6.1. Representación esquemática del metabolismo del Benzo[a]pireno en humanos. EH: Epóxido hidrolasa. GST: Glutation-S-Transferasa (www.atsdr.cdc.gov).

Las monoxigenasas dependientes del citocromo P 450 (CYP1A) son responsables de la oxidación enzimática de los HAPs. Ellas actúan sobre una zona de elevada densidad electrónica al nivel de la región angular de la molécula de los HAPs formando epóxidos que pueden espontáneamente formar fenoles, o por acción de las epóxido hidrolasas, producir dihidrodiolios.

De estos fenoles algunos son oxidados a quinonas y otros producen epóxidos secundarios (di-hidrodiolépóxidos), que son las formas más reactivas con el ADN. El carbono benzílico de los dihidrodiolépóxidos es capaz de reaccionar con las porciones nucleofílicas del ADN (fundamentalmente con guanidina) y eventualmente iniciar un proceso mutagénico. Reacciones semejantes se observan con otras macromoléculas como la albúmina y la hemoglobina.

Los dihidrodiolepóxidos son altamente inestables y cuando no reaccionan rápidamente, son hidrolizados a tetroles, cuya formación puede ser utilizada como bioindicador de formación de diolepóxidos.

Los fenoles, las quinonas y los dihidrofenoles pueden sufrir conjugación formando sulfatos y glucurónidos. Las quinonas y los diolepóxidos también reaccionan con el glutatión (mediante una glutatión-S-transferasa) y pueden ser eliminados por orina como tioéteres (Spivack 2001).

3.7 Marcadores biológicos de exposición a HAPs

Cuando hay absorción de HAPs en el cuerpo, se produce una reacción que es similar para todos los HAPs, esta reacción puede ser usada para desarrollar un marcador biológico. Una pequeña dosis de HAP puede reaccionar con los sitios nucleofílicos del ADN, dando lugar a un aducto HAP – ADN. Normalmente, la determinación cuantitativa de aductos de HAP - ADN se realiza por marcación con ^{32}P , sin embargo, esta determinación no es fácil debido a las pequeñas concentraciones en las que se encuentran estos compuestos, a la eficiencia de los mecanismos biológicos de reparación y a la dilución de los aductos por la división celular (Mastrandea *et al.* 2005)

Por esto, se ha puesto particular atención en el estudio de los aductos formados por reacción entre los agentes carcinógenos y las proteínas, como indicadores de nivel de reacción con el ADN. La hemoglobina es una proteína utilizada en estas técnicas y tiene una vida media de 120 días, lo que la hace útil como indicador de exposición a agentes mutagénicos. Algo similar ocurre con la albúmina, que es una proteína sintetizada por el hígado y posee una vida media de 21-25 días y sirve como transportadora de compuestos lipofílicos. Los dihidrodiolepóxidos de muchos HAPs pueden formar ésteres con los residuos del ácido aspártico o ácido glutámico de la albúmina (Frank *et al.* 1998).

En la tabla 3.7.1 se resumen las características de los marcadores biológicos de exposición a HAPs, algunos de los cuales pueden ser aplicados en forma rutinaria en trabajadores expuestos.

Tabla 3.7.1. Marcadores biológicos de exposición a HAPs (Jongeneelen 1997).

Agente	Marcador Biológico	Método Analítico
Mezcla total de HAPs	Aductos HAPs - ADN	Marcador ³² P
Mezcla total de HAPs	Tioéteres urinarios	Espectrofotométrico
Mezcla total de HAPs	Mutagenicidad en orina	Ensayo de microsomas de <i>Salmonella</i>
HAP específico	HAP en orina después de reducción	CG / EM
HAP específico	HAP hidroxilado	CG / EM
Benzo[a]pireno	Aducto ADN - benzo[a]pireno en glóbulos blancos	ELISA, USERIA
Benzo[a]pireno	Aducto hemoglobina - benzo[a]pireno	ELISA, SSF, CLAR
Benzo[a]pireno	Aducto albúmina - benzo[a]pireno	ELISA
Benzo[a]pireno	3-hidroxi-benzo[a]pireno	Fluorescencia inducida por láser
Fenantreno	Hidroxfenantrenos en orina	CG / EM
Pireno	Hidroxipireno en orina	CLAR-Fluorescencia

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

USERIA: Ultrasensitive Enzymatic RadioImmunoAssay

SSF: Synchronous Scanning Fluorescence

El pireno, si bien no es cancerígeno y sus efectos genotóxicos son limitados (*tabla 3.5.1*) es un elemento que está presente en la mayoría de los ambientes de trabajo donde existe una potencial liberación de HAPs. Por ello, el producto de su degradación metabólica, el 1-hidroxipireno, excretado por orina, es considerado en diferentes trabajos científicos (*tabla 3.11.2.2*) como el mejor indicador biológico de exposición a los HAPs debido a que no hay interferencia por el consumo de tabaco en la excreción urinaria de este metabolito (Jongeneelen *et al.* 1986, Jongeneelen *et al.* 1988, Elovaara *et al.* 2003, Xu *et al.* 2004, Kuusimäki *et al.* 2004, Zheng Li *et al.* 2006, Romanoff *et al.* 2006, Maissonette *et al.* 2006, Wegener *et al.* 2006, Jacob *et al.* 2007).

3.8 Límites de exposición a HAPs

El largo período de latencia entre la primera exposición y la aparición de los síntomas, junto a muchos otros factores, ha hecho que el establecimiento de valores límite umbral para los HAPs en la atmósfera del lugar de trabajo sea una tarea ardua y difícil. En 1967, la conferencia Americana de Higienistas Industriales del Gobierno de Estados Unidos (ACGIH, por sus siglas en inglés) adoptó un valor límite umbral (TLV, por sus siglas en inglés) de 0.2 mg/m^3 para los alquitranes de hulla volátiles, definiéndose como el peso de la fracción soluble en benceno de las partículas recogidas en un filtro. En 1997, la Administración sobre Salud y Seguridad Ocupacional de Estados Unidos (OSHA, por sus siglas en inglés) estableció un límite de exposición permisible (PEL, por sus siglas en inglés) para el BaP de 0.2 mg/m^3 . El límite de exposición recomendado (REL, por sus siglas en inglés) por el Instituto Nacional de Salud y Seguridad Ocupacional de Estados Unidos (NIOSH, por sus siglas en inglés) es de 0.1 mg/m^3 (Stellman 2001).

En la siguiente lista se han utilizado las mediciones de BaP en diferentes tipos de fuentes de trabajo para clasificarlos según el grado de exposición (Stellman 2001).

- Exposición muy alta ($> 10 \text{ mg/m}^3$): Trabajos en fábricas de coque, plantas de aluminio, fábricas que emplean electrodos de grafito, manipulación de breas y asfalto calentados.
- Exposición moderada ($0.1 - 10 \text{ mg/m}^3$): Trabajos en fábricas de coque, acerías, fábricas que emplean electrodos de grafito, plantas de aluminio y fundidoras.
- Exposición baja ($< 0.1 \text{ mg/m}^3$): Fundiciones, producción de asfalto, plantas de producción de aluminio con electrodos precocidos, talleres de reparación de automóviles, minas de hierro y construcción de túneles.

3.9 Usos de algunos HAPs

El naftaleno se utiliza en la síntesis de resinas y celuloideas, como insecticida, fungicida y antiséptico.

El antraceno se utiliza en la producción de antraquinona, una importante materia prima para la fabricación de colorantes rápidos. Se emplea también en los conservadores de madera y en la producción de fibras sintéticas y plásticos.

El fenantreno se utiliza en la fabricación de colorantes y explosivos, en la investigación clínica y la síntesis de fármacos.

El fluoranteno es un componente que se utiliza como material de revestimiento para proteger el interior de las tuberías de agua potable de acero y hierro dúctil y los tanques de almacenamiento (Budavari 2001).

3.10 Métodos analíticos para la determinación de HAPs

Los HAPs comúnmente se encuentran presentes como mezclas de isómeros, por lo que es necesario contar con métodos analíticos altamente sensibles y selectivos. La determinación de HAPs generalmente se lleva a cabo por técnicas cromatográficas incluidas la Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM) y CLAR con detector de UV o fluorimétrico. Dado que los diferentes HAPs poseen fluorescencia nativa, los métodos por CLAR con detección fluorométrica brindan una elevada sensibilidad, empleando pequeños volúmenes de muestra (Jongeneelen 1997, Baumard *et al.* 1997, Wu *et al.* 1997, Yeakub y Cole 2002, Kuusimäki *et al.* 2004).

El análisis de HAPs en muestras biológicas es particularmente complicado debido a la baja concentración en la que se encuentran en este tipo de matrices (ng/g) y por otro lado la gran cantidad de lípidos disueltos en el mismo solvente que los HAPs representan la principal interferencia en el análisis (Yeakub y Cole 2002).

Los procedimientos analíticos recomendados para la determinación de HAPs en muestras ambientales son propuestos por diversas organizaciones entre ellas la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés), en su método 550 describe la determinación de HAPs en muestras de agua potable por extracción líquido-líquido (ELL) con CH_2Cl_2 y separación por CLAR con detección acoplada de UV y fluorescencia. El método 525 describe la determinación de compuestos orgánicos en muestras de agua potable por extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) con C_{18} como adsorbente, CH_2Cl_2 como eluyente y detección por CG/EM (Hodgeson 1990, Schedl *et al.* 2001).

En la tabla 3.10.1 se presentan algunos ejemplos de la determinación de HAPs en diversas matrices reportados por distintos autores.

Tabla 3.10.1 Determinación de HAPs en diversas matrices.

Muestra / Analitos	Tratamiento previo	Extracción	Tratamiento adicional	LDM	Recobro (%)	Análisis	Referencia
Aire 16 HAPs	Tubos adsorbentes XAD-2	Ultrasonificación con ACN, elución: ACN/CH ₂ Cl ₂		0.007-0.513 µg/m ³		CLAR-DAD	Rossbach <i>et al.</i> (2007)
Agua superficial (20 mL) 10 HAPs		HS-SPME fibra: poliacrilato 85 µm extracción: 60 min, 50°C desorción: 2 min, 250°C		0.08-0.20 µg/L		GC-FID	Zuazagoitia <i>et al.</i> (2007)
Agua potable (250 mL) 16 HAPs		SPE Cartucho Supelclean Envi-18, Disco Envi-18 DSK 47 mm acond: CH ₂ Cl ₂ 5 mL/MeOH 5mL/H ₂ O 10 mL Elución: CH ₂ Cl ₂ 3 mL x 3 ELL CH ₂ Cl ₂ 15 mL x 3 Agitar 2 min	SPE/ELL Reconstituir en ACN	GC/MS 28-89 ng/mL CLAR-FLD-UV 0.41-21 ng/mL	SPE cartucho (43-79) SPE Disco (56-96) ELL (60-105)	GC/MS CLAR-FLD-UV	Díaz <i>et al.</i> (2007)
Mejillones (1g) 16 HAPs	Secar y tamizar hasta < 0.25 mm. Homogenizar	ELL Acetona/hexano 1:1, 3 mL x 3, sonicar, centrifugar	FS (silica y Hexano)	0.05-0.30 µg/g (*) 0.10-0.70 µg/g (**)	58-97 (*) 36-92 (**)	GC/MS/IT CLAR-DAD	Filipkowska <i>et al.</i> (2005)
Salmon (0.6-0.8 g) 16 HAPs	MSPD Mezclar con C ₁₈ 2 g / Na ₂ SO ₄ 0.5 g	columna Florisil 2 g/C ₁₈ 1 g elución: ACN 10 mL		0.04-0.32	80-94	CLAR-FL	Pensado <i>et al.</i> (2005)
Suelo (5 mg) sedimentos (10 mg) 16 HAPs	Tamizar ~ 4mm, homogenizar y secar por 3 días	PHWE-MMLLE-GC, extracción: 300°C, 30 min, 8 bar, 1mL/min con ciclohexano Membrana: epóxido (25-100°C, 30-60 min) con tolueno		Suelo: 18-321 µg/g Sedimentos: 0.33-3.19 µg/g	92-119	GC/MS	Kousmanen <i>et al.</i> (2003)
Pan tostado (0.5 g) 16 HAPs		ELL H ₂ O/AcET-CH ₂ Cl ₂ 4 mL, sonicar 8 min, centrifugar 15 min,	Reconstituir en ACN, filtrar con membrana de PTFE	LD 0.042-33 µg/Kg LC 0.14-110 µg/Kg	70-86	CLAR-FL	Nieva-Cano <i>et al.</i> (2001)

*PHWE-MMLLE-GC: Pressurised hot water extraction-Microporous membrane-liquid-liquid
extraction-Gas Chromatography*

** Obtenidos por GC/MS/IT*

*MSPD: Matrix Solid-Phase Dispersion
Extraction*

*** Obtenidos por HPLC-DAD*

HS-SPME: Head Space-Solid Phase Micro

3.11 Técnicas de preparación de muestras para la determinación de HAPs.

La preparación de muestra como paso previo para el análisis instrumental, es importante teniendo como objetivos principales una limpieza y/o concentración de la muestra. La limpieza se requiere cuando la muestra contiene impurezas que interfieren en la medición del analito de interés. La concentración del analito, se realiza cuando el analito está en un orden de concentración (diluido) en la muestra que no puede ser medido de manera directa. En los métodos de determinación de HAPs se han utilizado técnicas de preparación de muestra como la extracción líquido-líquido (ELL), extracción en fase sólida (SPE), extracción con fluidos supercríticos (SFE), micro extracción en fase sólida (SPME), dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), etc. (*tabla 3.10.1*), sin embargo la extracción líquido-líquido (ELL) ha sido la técnica más comúnmente usada durante muchos años en los métodos de determinación de HAPs. Actualmente la extracción en fase sólida es la técnica de preparación de muestra más comúnmente utilizada para el análisis de HAPs, tanto en muestras biológicas como en muestras ambientales debido a su alta reproducibilidad y selectividad. A continuación se describen brevemente estas dos técnicas de preparación de muestra.

3.11.1 Extracción líquido-líquido

Se basa en la distribución de los componentes de una muestra entre dos fases líquidas inmiscibles. En la forma clásica se emplea un embudo, el cual es agitado manualmente permitiendo que los componentes de la mezcla se distribuyan en ambas fases. Esta técnica proporciona excelentes resultados aunque es un proceso largo y costoso debido a las grandes cantidades de muestra y disolventes que se emplean. Presenta el inconveniente de que se co-extraen una gran cantidad de compuestos que interfieren en el análisis cromatográfico, de aquí que sea de gran importancia las etapas posteriores de limpieza y purificación.

Actualmente se han desarrollado vertientes de la extracción líquido-líquido como la extracción asistida por microondas, la cual se basa en la absorción de energía de microondas por la muestra produciendo un incremento en la temperatura y facilitando la difusión de los compuestos de interés desde la matriz al disolvente. Por otro lado la extracción acelerada por disolventes es una técnica en la cual un disolvente a una temperatura y presión establecidas pasa a través de una columna de material sólido seco consiguiendo así que la cantidad de disolvente necesaria para la extracción sea

menor. Estas últimas técnicas han sido empleadas en algunos métodos de determinación de HAPs en matrices acuosas, sin embargo para matrices biológicas, son pocas las referencias citadas (Filipkowska *et al.* 2005, Nieva-Cano *et al.* 2001, Yeakub y Cole 2002, Hodgeson 1990).

3.11.2 Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida consiste en una extracción de tipo líquido-sólido a través de una columna o cartucho. El cartucho (*Fig. 3.11.2.1*) que contiene a la fase sólida tiene normalmente forma de jeringa y el material que lo forma puede ser de vidrio o de polipropileno y contiene, entre dos filtros de polietileno, al adsorbente (fase sólida) empacado en cantidades que varían entre los 100 y los 1000mg; los adsorbentes más utilizados son alúmina, florisil o sílica unida a octadecil (C_{18}), octil (C_8), ciclohexil o fenil, con capacidades de volumen entre 1 a 6mL. Las fases sólidas deben tener un tamaño de partícula adecuado de manera que su área superficial sea lo suficientemente grande para interactuar y atrapar los analitos de interés.

En la extracción en fase sólida se tienen mecanismos de adsorción-desorción de los analitos en la superficie del material activo de las columnas. La retención y la elución obedece a las distintas interacciones intermoleculares entre el analito y los grupos funcionales del adsorbente, las fuerzas que intervienen en estos mecanismos pueden ser iónicas, puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo, Van der Waals, etc., existiendo un equilibrio entre la concentración del analito en la fase estacionaria y la fase móvil.

En la figura 3.11.2.1 se esquematiza el proceso de extracción en fase sólida por etapas (Sigma-Aldrich Co. 1998).

Basándose en estudios previos de determinación de metabolitos de HAPs en muestras de orina, los cuales se presentan en forma resumida en la tabla 3.11.2.2, en este trabajo se aplicó la técnica de extracción en fase sólida en la preparación de las muestras de orina.

Tabla 3.11.2.2. Técnicas de preparación de muestra para la determinación de metabolitos de HAPs en orina.

Muestra/ Analitos	Tratamiento previo	Extracción	Tratamiento adicional	LDM	Recobro (%)	Análisis	Referencia
Orina humana (2.7mL) Metabolitos de naftaleno, fluoreno, fenantreno y pireno	Hidrólisis enzimática β -glucuronidasa/sulfatasa, incubación a 37°C por 17 h	Pentano/Acet, 90:10 4 mL, centrifugación	Adición de ácido gálico/MeOH, centrifugación	LCM (0.01-0.5 ng/mL)	72-83	LC/MS/MS	Jacob <i>et al.</i> (2007)
Orina humana (3 mL) 24 OH-HAPs de 9 HAPs	Adición de EI de 12 OH-HAPs de C ¹³ , hidrólisis enzimática β -glucuronidasa/arilsulfatasa, incubación a 37°C por 17 h	SPE Cartucho Focus C ₁₈ acond: MeOH 1mL/H ₂ O 1 mL, lavado: H ₂ O 1mL, buffer acetato de sodio/MeOH 3mL, elución: CH ₂ Cl ₂ 3mL	Adición de dodecano reconstituir con tolueno. Adición de benzo[b]fluoranteno C ¹³ . Derivación con MSTFA a 60°C por 30 min.	pg/mL	63-93	GC/HRMS	Romanoff <i>et al.</i> (2006)
Orina humana (10 mL) 1-OHP 3-OH-BP	Inmovilización de anticuerpos, procedimiento de inmunoestracción	SPE Cartucho C ₁₈ acond: MeOH 3mL/H ₂ O 4 mL, lavado: ACN 0.5 mL, elución: ACN 3 mL		3-BP-G (1.2 ng/L)	1-OH-P (21) 3-BP-G: (82) 1-P-G: (61)	CLAR-FL	Maisonnette <i>et al.</i> (2006)
Orina humana (11 mL) 1-OHP 1-OHP-G	Hidrólisis enzimática β -glucuronidasa/sulfatasa, incubación a 37°C	SPE Cartucho C ₁₈ acond: MeOH 5mL/H ₂ O 10 mL, lavado: H ₂ O 10 mL, elución: MeOH 10 mL			1-OHP (71.4) 1-OHP-G (89.5)	CLAR-FL	Wegener <i>et al.</i> (2006)
Orina humana (2 mL) 24-OH-HAPs de 9 HAPs	Hidrólisis enzimática β -glucuronidasa, incubación a 37°C por 18 h	ELL Automatizada con pentano 5mL x 3 Centrifugación 2800 rpm	Adición de dodecano. Reconstituir con tolueno. Adición de ¹³ C ₁₂ -3-MeO-CB79. Derivación con MSTFA a 60°C por 30min.	<7 pg/mL	Todos entre 66-72, excepto 1-naftol (46)	GC/HRMS	Zheng Li <i>et al.</i> (2006)
Orina humana (10 mL)	Hidrólisis enzimática β -glucuronidasa/arilsu	SPE Cartucho Sep-Pak C ₁₈		0.1-5 pg/mL	70-80	LC/MS/MS	Xu <i>et al.</i> (2004)

1-, 2-naftol 2-OHFlu 3-, 9-OHFen 1-OHP 3-, 9-OHFlu 1-OHBaA 3-OH-BP 2-OHBFen 3-, 6-OHChr	lfatasa, incubación a 37°C	Acond: MeOH 5mL/H ₂ O 10 mL, lavado: H ₂ O 3 mL/MeOH 3mL Elución: MeOH 10 mL					
Orina humana (10mL) 1-OHP 2-naftol 1-, 2-, 3-, 4-, 9-OHFen	Hidrólisis enzimática β-glucuronidasa/arilsulfatasa, incubación a 37°C por 17 h	SPE Cartucho Bond Elut C ₁₈ Acond: MeOH 10mL/H ₂ O 10 mL, lavado: H ₂ O 10 mL, elución: MeOH 9 mL		LCM 2-naftol (6.9 mol/L) 1-OHP (0.7 mol/L) 1-, 2-, 3-, 4-, 9-Fen (0.7-0.8 nmol/L)	2-naftol (84) 1-OHP (57) 1-, 2-, 3-, 4-, 9-Fen (61-85)	CLAR-FL	Kuusimäki <i>et al.</i> (2004)
Orina de rata (1mL) 1-OHP naftoles fenantroles	Hidrólisis enzimática β-glucuronidasa/arilsulfatasa, incubación a 37°C por 17 h	SPE Cartucho Bond Elut C ₁₈ Acond: MeOH 10mL/H ₂ O 10 mL, lavado: H ₂ O 10 mL, elución: MeOH 9 mL		1-OHP (0.1 μg/L) 1-naftol (2 μg/L) 2-naftol (0.3 μg/L) fenantroles (0.2 μg/L)	1-OHP (55.2) naftoles (58-82) fenantroles (52-75)	CLAR-FL	Elovaara <i>et al.</i> (2003)
Orina humana (10mL) 1-OHP 1-, 2-, 3-, 4-, 9-OHFen 3-OH-BP	Hidrólisis enzimática β-glucuronidasa/sulfatasa, incubación a 37°C por 16 h, centrifugación por 10 min	Cartucho de inmunoprecipitación IgG/TMOS Acond: ACN/H ₂ O 3 mL, acetato de sodio 0.05 M Lavado: acetato de sodio 0.1 M/H ₂ O 6 mL y ácido úrico Elución: ACN/H ₂ O 3 mL	SPE Cartucho Lichrolut RP18e Acond: MeOH 6 mL/ H ₂ O 6 mL Lavado: disolución de ascorbato Elución: acetona/CH ₂ Cl ₂ 3 mL reconstituir en MeOH/H ₂ O 6:4	1-OHP (1 ng/L) 1-, 2-, 3-, 4-, 9-Fen (2-3 ng/L) 3-OH-BP (1 ng/L)	1-OHP (95) 1-, 2-, 3-, 4-, 9-Fen (84-101) 3-OH-BP (62)	CLAR-DAD-FL GC/HR MS	Schedl <i>et al.</i> (2001)

MSTFA: N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida

1-OHP: 1-hidroxipireno
glucurónido

3-OH-BP: 3-hidroxibenzo(a)pireno
hidroxifluoreno

3-BP-G: 3-benzo(a)pireno-glucurónido

TMOS: Tetrametoxisilano

1-OHP-G: 1-hidroxipireno-

2-OH-Flu: 2-

IgG: Inmunoglobulina

2-OHFen: 2-hidroxifenantreno

hidroxibenzo(a)pireno

1-P-G: 1-pireno-glucurónido

hidroxibenzo[c]fenantreno

3-OHFln: 3-hidroxifluoranteno

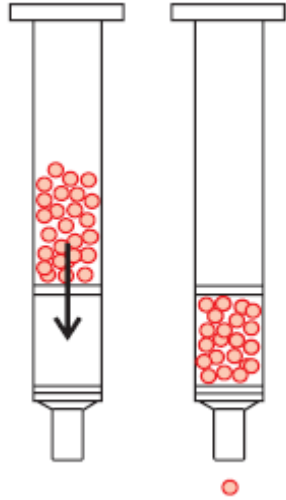
¹³C₁₂-3-MeO-CB79: 3-hidroxi-3,3',4,5'-tetraclorobifenilo

1-OHBaA: 1-

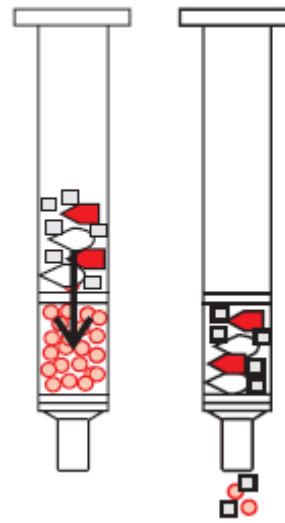
2-OHBFen: 2-

3-OHChr: 3-hidroxicriseno

ETAPA 1. ACONDICIONAMIENTO DEL CARTUJO



ETAPA 2. ADICIÓN DE MUESTRA



ETAPA 3. ELIMINACIÓN DE INTERFERENCIAS

ETAPA 4. ELUCIÓN DE LOS ANALITOS DE INTERÉS

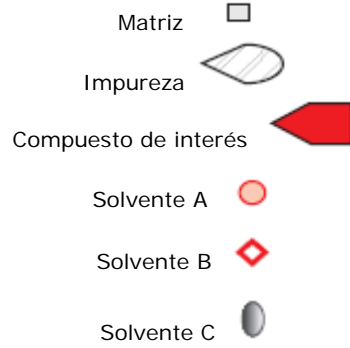
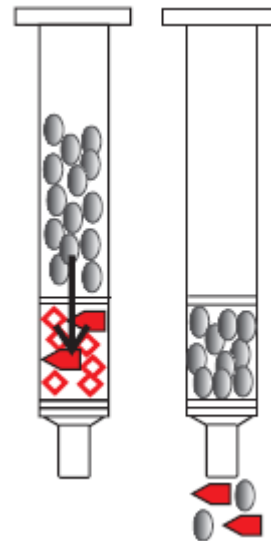
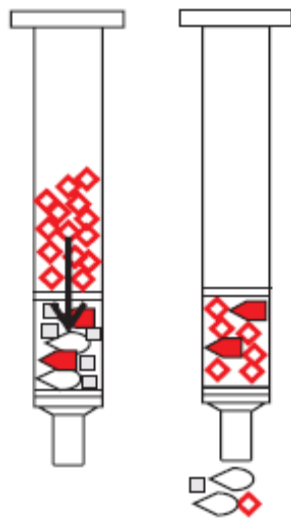


Figura 3.11.2.1. Etapas de la extracción en fase sólida.

CAPITULO 4

DESARROLLO EXPERIMENTAL

El trabajo experimental de esta tesis consta de las siguientes etapas:

- Optimización de las condiciones instrumentales para la separación por CLAR-UV-FL de 16 HAPs y 5 metabolitos monohidroxilados.
- Evaluación de parámetros cromatográficos: factor de capacidad (k'), eficiencia (evaluada como altura equivalente a un plato teórico (H)), resolución (R_s) y selectividad (α).
- Optimización de las condiciones de extracción en fase sólida para la recuperación de los metabolitos en muestras de orina.
- Evaluación de parámetros de validación: linealidad, especificidad, precisión, límite de detección y límite de cuantificación del instrumento y del método.
- Evaluación de interferencias de HAPs en la determinación de hidroxi-HAPs.

4.1 Instrumentación

Cromatógrafo de líquidos modular marca Hewlett Packard serie 1100. Este equipo consta de los siguientes módulos:

- Degasificador de vacío.
- Bomba de gradiente de cuatro canales.
- Inyector automático.
- Compartimiento termostatzado para columnas.
- Detector de arreglo de diodos con celda de micro flujo de 1.7 μL .
- Detector de fluorescencia con celda de flujo de 8 μL .

4.2 Equipo y Material

- Balanza analítica electrónica marca OHAUS con precisión de 0.1 mg.
- Micropipeta Wheaton Socorex de 5 a 50 μL
- Micropipeta Gilson de 50 a 200 μL .
- Micropipeta Labsystems de 200 a 1000 μL .
- Micropipeta Labsystems de 1 a 5 mL
- Pipeta volumétrica de 10 mL.
- Matraces volumétricos de 10 mL clase A.
- Matraces volumétricos de 5 mL clase A.

- Matraces volumétricos de 1 mL clase A.
- Viales de vidrio con tapa de PTFE de capacidad de 2 mL, Agilent.
- Filtros Millipore tipo HA de 0.45 µm, 47 mm.
- Frascos de polietileno
- Columna cromatográfica: Atlantis™ dC18, 2.1 x 50 mm, 3µm, Waters.
- Cartuchos para extracción en fase sólida Bakerbond, octadecilsilano (C₁₈) 40 µm, 60 A, 500 mg, J.T. Baker.
- Columna cromatográfica monolítica: Chromolith Performance RP-18e 4.6 x 100 mm, Merck.
- Columna cromatográfica Whatman Partisil 5ODS, 4.6 x 250 mm, 5 µm.
- Guarda columna C₁₈ (ODS, octadecil) 3.0 x 4.0 mm, Phenomenex.
- Sistema de vacío múltiple con control de presión, J.T. Baker.

4.3 Reactivos y muestras

Los reactivos utilizados para la preparación de las disoluciones se muestran en la tabla 4.3.1.

Tabla 4.3.1 Reactivos utilizados para la preparación de disoluciones.

<i>Compuesto</i>	<i>Pureza</i>	<i>Compañía</i>	<i>Lote</i>
Acenafteno	99%	Aldrich Chemical Company Inc.	11016DX
Acenaftileno	75%	Aldrich Chemical Company Inc.	00723DZ
Antraceno	97%	Aldrich Chemical Company Inc.	17607BZ
Benz(e)acefenantrileno	99%	Aldrich Chemical Company Inc.	01323JZ
1,2-benzantraceno	95%	Sigma Chemical Co.	61H3544
Benzo(k)fluoranteno	99%	Chem Service	30-53
Benzo(a)pireno	98%	Aldrich Chemical Company Inc.	05716DZ
Bifenilo	99%	Aldrich Chemical Company Inc.	01721KZ
Criseno	98%	Aldrich Chemical Company Inc.	01221JJ
1,2:5,6-dibenzantraceno	97%	Aldrich Chemical Company Inc.	08121CY
Fenantreno	98%	Aldrich Chemical Company Inc.	01128EZ
Fluoranteno	98%	Aldrich Chemical Company Inc.	08818JY
Fluoreno	98%	Aldrich Chemical Company Inc.	02921DZ
Indeno	90%	Aldrich Chemical Company Inc.	06422AZ
Naftaleno	99%	Aldrich Chemical Company	05902CZ
Pireno	99%	Aldrich Chemical Company Inc.	05230DX

1-acenaftanol	99%	Aldrich Chemical Company Inc.	02316KE
9-fenantrol	Grado técnico	Aldrich Chemical Company Inc.	05107BE
α -naftol	Grado técnico	J.T.Baker	11542
β -naftol	Grado técnico	J.T. Baker	NR
1-hidroxipireno	98%	Aldrich Chemical Company Inc.	05818KD
Nitrato de potasio	99%	Productos Químicos Monterrey	081054
Sulfato de sodio	Q.P.	REPROQUIFIN	9662-R

NR: No reportado en la etiqueta

El metanol y acetonitrilo utilizado para la preparación de las disoluciones y fase móvil fue grado cromatográfico marca J.T. Baker - Mallinckrodt, lotes: V20C02, V44C14, X41C21, H488KPCJ; U01C58

El agua utilizada para la fase móvil fue purificada y desionizada mediante un sistema Ultrapure water system, Barnstead / Thermolyne.

Tabla 4.3.2 Descripción de las muestras de orina estudiadas.

Muestra	Descripción	Concentración aproximada del estándar de fortificación ¹	Volumen de estándar adicionado	Concentración en la muestra
M1	Mujer, 34 años	10 mg/L	835 μ L	0.835 mg/L
M2	Hombre, 23 años	10 mg/L	835 μ L	0.835 mg/L
M3	Hombre, 24 años	10 mg/L	835 μ L	0.835 mg/L

¹ El estándar de fortificación consiste de una mezcla de β -naftol 10 mg/L, 1-acenaftanol 10 mg/L, α -naftol 9.6 mg/L, 9-fenantrol 9.6 mg/L y 1-hidroxipireno 11.2 mg/L en orina.

4.4 Preparación de disoluciones

Disolución madre de HAPs (aproximadamente 50 mg/L).

Se pesó aproximadamente y con precisión 5 mg de cada uno de los 16 HAPs enlistados en la tabla 4.3.1. La mezcla obtenida se disolvió en metanol y se llevó al aforo a un volumen de 100 mL.

Disoluciones estándar de HAPs.

A partir de la disolución madre de HAPs se prepararon disoluciones estándar de 40, 30, 20, 10, 8, 6, 4, 2, 1 y 0.5 mg/L, aproximadamente.

Disolución madre de hidrox-HAPs I (aproximadamente 500 mg/L).

Se pesó aproximadamente y con precisión 5 mg de cada uno de los 5 hidrox-HAPs enlistados en la tabla 4.3.1. La mezcla obtenida se disolvió en acetonitrilo y se llevó al aforo a un volumen de 10 mL.

Disoluciones estándar I de hidrox-HAPs.

A partir de la disolución madre de hidrox-HAPs se prepararon disoluciones estándar de 100, 80, 60, 40, 20, 10, 8, 6, 4, 2 y 1 mg/L, aproximadamente.

Disoluciones estándar II de hidrox-HAPs.

A partir de las disoluciones estándar I de hidrox-HAPs se prepararon disoluciones de 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, y 0.1 mg/L, aproximadamente.

Disoluciones estándar III de hidrox-HAPs.

A partir de las disoluciones estándar II de hidrox-HAPs se prepararon disoluciones de 0.08, 0.06, 0.04, 0.02, y 0.01 mg/L, aproximadamente.

Disolución estándar IV de hidrox-HAPs.

A partir de la disolución estándar de 2 mg/L se preparó una disolución de 0.05 mg/L aproximadamente.

Disolución estándar V de hidrox-HAPs.

A partir de la disolución estándar de 8 mg/L se preparó una disolución de 0.08 mg/L aproximadamente.

Disolución madre de hidrox-HAPs II (aproximadamente 50 mg/L).

A partir de disoluciones individuales de cada uno de los hidrox-HAP se preparó una disolución de 50 mg/L aproximadamente.

Disolución madre de hidrox-HAPs en orina (aproximadamente 10 mg/L).

A partir de la disolución madre de hidrox-HAPs II se preparó una disolución en orina de 10 mg/L aproximadamente.

Disoluciones estándar de hidrox-HAPs en orina.

De la disolución madre de hidrox-HAPs en orina se prepararon disoluciones en orina de 1, 0.82, 0.7, 0.45, 0.28, 0.2 y 0.1 mg/L, aproximadamente.

NOTA: Las concentraciones reales de cada compuesto se pueden consultar en el apéndice 3, tablas A3-1, A3-2 y A3-3.

4.5 Preparación de muestra

4.5.1 Toma de muestra

Las muestras de orina fueron obtenidas de personas voluntarias no expuestas laboralmente a HAPs entre las que se encuentran hombres y mujeres de 23 a 50 años de edad. Las muestras se recolectaron en frascos de polietileno. Posteriormente se filtraron a través de un filtro de 0.45 μ m de tamaño de poro.

Del filtrado se tomaron alícuotas de 10 mL y se fortificaron con las cantidades descritas en la tabla 4.3.2, para posteriormente someterlas a extracción en fase sólida.

4.5.2 Tratamiento por extracción en fase sólida

La extracción, concentración y limpieza de las muestras de orina se llevó a cabo por la técnica de extracción en fase sólida con cartuchos de octadecilsilano (C₁₈) 40 μ m, 60 A, 500 mg utilizando un sistema de vacío múltiple con control de presión.

Los cartuchos se acondicionaron con 5 mL de metanol y 10 mL de agua, manteniendo un goteo de 30 gotas por minuto; sin cerrar el vacío pero procurando no dejar secar el cartucho se adicionó la muestra, posteriormente se hizo un lavado con 10 mL de una mezcla agua/acetonitrilo 90:10 y se dejó abierto el vacío durante 5 minutos para secar el cartucho.

Se eluyó con 5 mL de acetonitrilo descartando las primeras gotas. Nuevamente se dejó abierto el vacío durante 5 minutos para secar el cartucho.

El extracto se pasó a través de un embudo de vidrio conteniendo sulfato de sodio anhidro. Se evaporó el disolvente con corriente de nitrógeno hasta un volumen aproximado de 0.5 mL.

El residuo se transfirió a un matraz volumétrico de 1 mL y se llevó al aforo con acetonitrilo. Finalmente se transfirió a un vial de vidrio para su inyección en el equipo de CLAR-UV-FL.

En la figura 4.5.2.1 se resume el procedimiento de extracción en fase sólida de las muestras de orina.

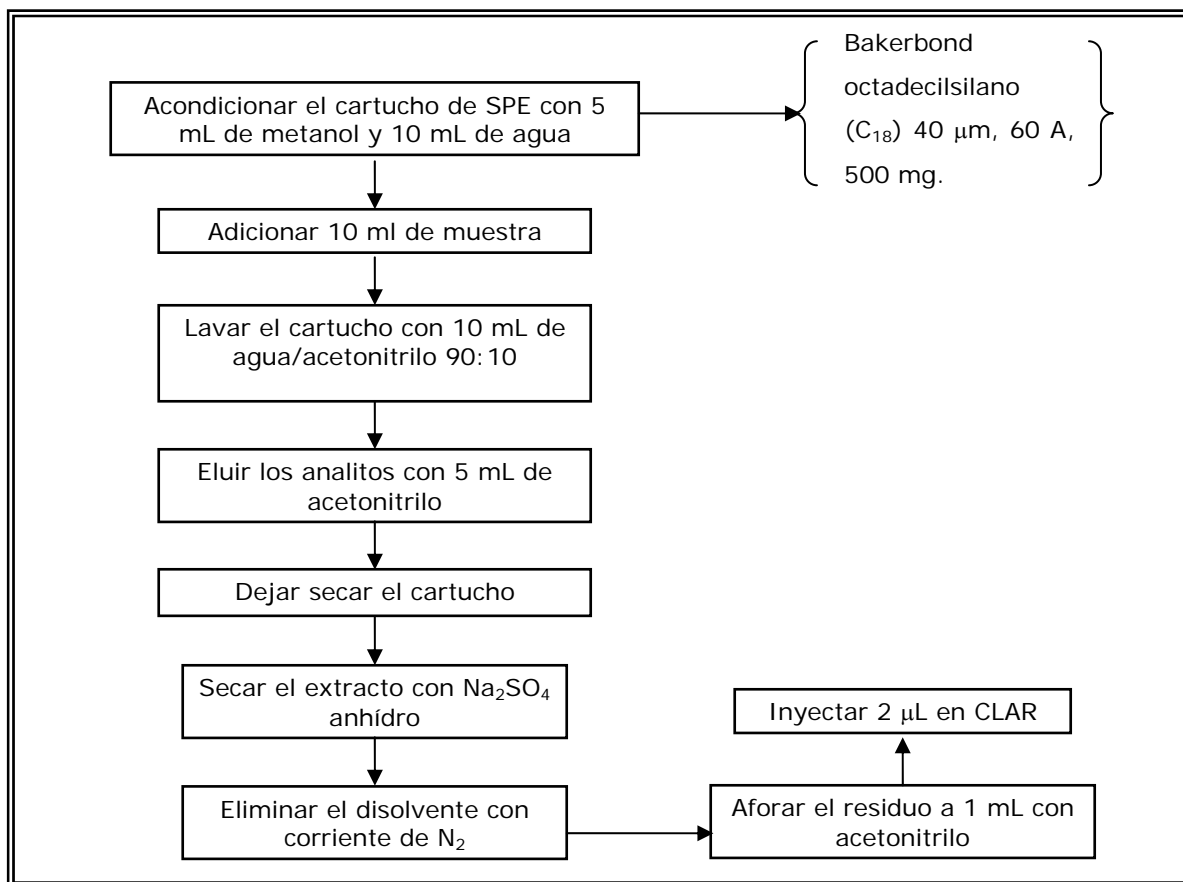


Figura 4.5.2.1 Tratamiento por extracción en fase sólida de las muestras de orina fortificadas con hidroxi-HAPs.

4.6 Optimización de las condiciones instrumentales para la separación por CLAR de 16 HAPs y 5 metabolitos hidroxilados.

Primeramente se inyectaron en el equipo de CLAR disoluciones individuales de cada uno de los 16 HAPs descritos en la tabla 4.3.1 para determinar el tiempo de retención y obtener los espectros de UV de cada compuesto.

Con los valores de longitud de onda de máxima absorción obtenidos de los espectros de UV (*apéndice 1*) de cada compuesto se eligieron 4 longitudes de onda comunes a todos: 230, 254, 260 y 275 nm y se realizó una inyección de una disolución estándar de 50 mg/L a esas longitudes de onda. De los resultados obtenidos se eligió aquella a la cual se obtiene la mejor respuesta de todos los compuestos.

Para optimizar el programa de longitudes de onda de emisión del detector de fluorescencia se realizó una inyección de una disolución estándar de 10 mg/L a cuatro longitudes de onda de emisión distintas: 350, 420, 440 y 500 nm, manteniendo la longitud de onda de excitación fija en 260 nm.

Posteriormente se realizó la optimización del gradiente de elución, variando la proporción de disolvente orgánico en la fase móvil y evaluando los parámetros cromatográficos resolución (R_s) y factor de capacidad (k') en cada inyección hasta obtener resultados adecuados, así como, un tiempo de análisis lo más corto posible.

Con las condiciones instrumentales óptimas se inyectó una disolución de 20 mg/L de los 5 hidrox-HAPs descritos en la tabla 4.3.1 y no se obtuvo una buena separación, por lo tanto se optimizó la separación en una columna de mayor longitud y se cambió de disolvente orgánico a acetonitrilo, variando la proporción de éste hasta obtener resultados de resolución (R_s), factor de capacidad (k') y tiempo de análisis aceptables.

La optimización de la longitud de onda de excitación y emisión se realizó inyectando varias veces una disolución estándar de 100 mg/L a 6 longitudes de onda de excitación diferentes y en un intervalo de 280 nm a 500 nm de longitud de onda de emisión hasta obtener la mejor respuesta de los compuestos.

4.7 Evaluación de parámetros cromatográficos

Se realizaron cálculos de factor de capacidad (k'), eficiencia (H), resolución (R_s) y selectividad (α) en cada inyección, por medio del Software HP Chemstation for LC revisión A.06.03, Hewlett Packard (1990-1998).

Este software calcula estos parámetros de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

Factor de capacidad

$$k' = \frac{tr - t_0}{t_0}$$

Donde tr es el tiempo de retención del compuesto y t_0 es el tiempo muerto.

Eficiencia

$$N = 5.54 \left(\frac{tr}{W_{1/2}} \right)^2$$

$$H = \frac{L}{N}$$

Donde $W_{1/2}$ es el ancho de pico a la mitad de la altura, L es la longitud de la columna y H es la altura equivalente a un plato teórico.

Resolución

$$R_s = 1.177 \left(\frac{tr_2 - tr_1}{W_{1/2A} + W_{1/2B}} \right)$$

Selectividad

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

(Manual de referencia "Understanding your Chemstation", Hewlett Packard 4ª edición, 1998, USA).

4.8 Optimización de las condiciones de extracción en fase sólida para la recuperación de los metabolitos en muestras de orina.

Se probaron distintos disolventes de acondicionamiento, lavado y elución de los cartuchos de extracción en fase sólida, evaluando en cada extracción el % de recobro de analitos. Se escogieron 4 disolventes de polaridad intermedia, considerando una escala en donde el disolvente de máxima polaridad es el agua (índice de polaridad =

9.0) y el de menos polaridad el hexano (índice de polaridad = 0), las variaciones que se hicieron en las condiciones de extracción se indican en la tabla 4.8.1.

Tabla 4.8.1. Variación de condiciones en la técnica de SPE.

	<i>Condiciones 1</i>	<i>Condiciones 2</i>	<i>Condiciones 3</i>
<i>Acondicionamiento del cartucho</i>	acetonitrilo	acetonitrilo	metanol/agua
<i>Lavado del cartucho</i>	agua/acetonitrilo (90:10)	agua/acetonitrilo (90:10)	agua/acetonitrilo (90:10)
<i>Elución</i>	acetonitrilo	cloruro de metileno/acetato de etilo (50:50)	acetonitrilo

Las mejores condiciones de extracción en fase sólida se eligieron de acuerdo a la mayor recuperación de metabolitos obtenida. El % de recobro se evaluó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{\left(\frac{A-b}{m}\right) / f}{C / f} * 100$$

En donde A es el área del pico cromatográfico, b es la ordenada al origen de la curva de calibración, m es la pendiente de la curva de calibración, f es el factor de dilución y C es la concentración del estándar con el que fue fortificada la muestra de orina.

4.9 Evaluación de parámetros de validación

4.9.1 Linealidad.

La linealidad del instrumento se evaluó inyectando por triplicado 11 disoluciones de HAPs en el intervalo de concentración de 50 - 0.5 mg/L, en las condiciones instrumentales descritas en la sección 5.1.

También se realizaron inyecciones por triplicado de 15 disoluciones estándar de hidroxi-HAPs en el intervalo de concentración de 100 - 0.1 mg/L con las condiciones instrumentales descritas en la sección 5.1.

Adicionalmente se realizaron inyecciones por triplicado de 5 disoluciones estándar de hidroxi-HAPs en el intervalo de concentración de 0.1 - 0.01 mg/L con las mismas condiciones instrumentales.

Con los datos obtenidos, se construyeron las gráficas correspondientes a las curvas de calibración para cada compuesto, siendo el eje de las abscisas los valores de concentración y el eje de las ordenadas los valores de área de pico obtenidos.

Se realizaron los ajustes por mínimos cuadrados de las rectas obtenidas con el software Origin[®] 6.1 (1991-2000) Origin Lab Corporation.

Para evaluar la linealidad del método se inyectaron por triplicado 5 disoluciones estándar de hidroxi-HAPs en orina en el intervalo de concentración de 1 - 0.1 mg/L, las cuales fueron sometidas al proceso de extracción en fase sólida descrito en la sección 4.5.2.

De igual forma se construyeron las gráficas correspondientes a las curvas de calibración para cada compuesto y se obtuvo el ajuste por mínimos cuadrados con el software Origin[®] 6.1 (1991-2000) Origin Lab Corporation.

4.9.2 Especificidad

La especificidad del método se evaluó de acuerdo a la pureza de pico cromatográfico por medio del Software HP Chemstation for LC revisión A.06.03 Hewlett Packard (1990-1998) ¹, inyectando una muestra de orina fortificada con una mezcla de β -naftol (96 mg/L), 1-acenaftanol (100 mg/L), α -naftol (80 mg/L), 9-fenantrol (80 mg/L) y 1-hidroxipireno (120 mg/L) en el equipo de CLAR-UV-FL. La muestra de orina utilizada para este estudio fue sometida al proceso de extracción en fase sólida descrito en la sección 4.5.2.

¹ Este software determina un factor de pureza mediante la comparación de 5 espectros registrados durante la elución del pico cromatográfico; cuatro espectros en los puntos de inflexión y un espectro en el punto máximo del pico. Si los espectros no son idénticos, entonces el pico contiene una impureza espectral. Esta impureza espectral puede deberse a que los picos no están completamente separados en la base o bien por ruido de fondo. El factor de pureza del pico es entonces una medida de la similitud en la forma del espectro.

La comparación de los espectros se hace por medio del factor "match" o de coincidencia que se define como:

$$factor = \frac{10^3 \left\{ \sum xy - \left(\frac{\sum x \sum y}{n} \right) \right\}^2}{\left\{ \sum x^2 - \left(\frac{\sum x \sum x}{n} \right) \right\} \left\{ \sum y^2 - \left(\frac{\sum y \sum y}{n} \right) \right\}}$$

En donde los valores de x y y son las medidas de absorbancia del primer y segundo espectro respectivamente, a la misma longitud de onda; n es el número de datos y Σ es la suma de los datos. Si el factor de coincidencia es igual a 0 indica que no hay ninguna similitud en los espectros, si el factor es igual a 1000 indica que los espectros son idénticos. Generalmente a valores por encima de 990 indica que el espectro es similar; valores entre 900 y 990 indica alguna similitud. Los valores por debajo de 900 indican que el espectro es diferente.

El factor de coincidencia se puede ver influenciado por el nivel de ruido o por cambios espectrales debidos al disolvente (Manual de referencia "Understanding your Spectra Module", Hewlett Packard 4ª edición, 1998, USA).

4.9.3 Precisión

Para evaluar la precisión del instrumento se realizaron 10 inyecciones de la disolución estándar IV de hidroxi-HAPs de 0.05 mg/L y 10 inyecciones de la disolución estándar V de hidroxi-HAPs de 0.08 mg/L, estas concentraciones representan los puntos medio y 20% abajo de la mayor concentración de la curva de calibración, respectivamente, considerando un intervalo lineal de trabajo de 0.01 – 0.1 mg/L.

La precisión del método se evaluó inyectando 5 veces las disoluciones estándar de hidroxi-HAPs en orina de 0.28 mg/L y 0.82 mg/L, las cuales representan los puntos superior e inferior $\pm 20\%$ de la curva de calibración, considerando un intervalo lineal de trabajo de 0.1 – 1.0 mg/L.

El análisis de los datos se realizó empleando las siguientes ecuaciones (Miller y Miller 2002):

Media aritmética

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

Desviación estándar

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

Coeficiente de variación

$$CV = \frac{s}{x} * 100$$

4.9.4 Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación instrumentales de los 16 HAPs se determinaron a partir de una curva de calibración de 7 niveles en un intervalo de concentración de 10 – 0.5 mg/L, cada disolución se inyectó por triplicado en las condiciones descritas en la sección 5.1, obteniéndose un total de 21 datos que se emplearon para el cálculo de límite de detección y cuantificación de acuerdo a lo descrito en el apéndice 4A.

Los límites de detección y cuantificación instrumentales de los 5 Hidroxi-HAPs se determinaron a partir de una curva de calibración de 5 niveles en un intervalo de concentración de 0.1 - 0.01 mg/L, cada disolución se inyectó por triplicado en las condiciones descritas en la sección 5.1, obteniéndose un total de 15 datos que se emplearon para el cálculo de límite de detección y cuantificación de acuerdo a lo descrito en el apéndice 4A.

Para el estudio de límite de detección y cuantificación del método se inyectaron en las condiciones óptimas de separación de hidroxi-HAPs (*sección 5.1*) 10 réplicas de una muestra de orina fortificada con 100 µL de una disolución que contiene β-naftol 10 mg/L, 1-acenaftanol 10 mg/L, α-naftol 9.6 mg/L, 9-fenantrol 9.6 mg/L y 1-hidroxipireno 11.2 mg/L, la muestra de orina fue sometida al proceso de extracción en fase sólida descrito en la sección 4.5.2.

La concentración para este estudio fue de 0.1 mg/L aproximadamente, esta concentración representa el límite inferior de la curva de calibración de método.

Los límites de detección y cuantificación se calcularon en base a la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de calibración de método de cada compuesto. Las ecuaciones aplicadas para el cálculo de límite de detección de método y límite de cuantificación de método son las siguientes:

$$LDM = \frac{3s}{m}$$

$$LCM = \frac{10s}{m}$$

En donde s es la desviación estándar de N réplicas medidas y m es la pendiente de la curva de calibración.

4.10 Evaluación de interferencias de HAPs en la determinación de hidroxi-HAPs.

Se preparó una mezcla de HAPs e hidroxi-HAPs de una concentración de 20 mg/L, partiendo de las disoluciones madre de cada grupo de compuestos (*sección 4.4*). La mezcla se inyectó en las condiciones óptimas de separación de hidroxi-HAPs (*sección 5.1*).

CAPITULO 5

RESULTADOS

5.1 Optimización de las condiciones instrumentales

Las condiciones instrumentales con las cuales se logró la mejor separación de los HAPs son las siguientes:

Volumen de inyección: 3 μ l

Fase móvil: A: Agua

B: Metanol

Gradiente de elución:

<i>Tiempo (min)</i>	0	13	23	25	27
<i>% B</i>	60	60	100	60	60

Flujo: 0.5 ml/min

Columna: Atlantis™ dC18, 2.1 x 50 mm, 3 μ m

Temperatura de la columna: 20°C

Detector UV: $\lambda = 260$ nm, $\lambda_{ref} = 360$ nm

Programa de longitudes de onda del detector de fluorescencia:

<i>Tiempo (min)</i>	<i>Longitud de onda de excitación (nm)</i>	<i>Longitud de onda de emisión (nm)</i>
0.0	260	350
6.93	260	440
19.50	260	500
21.30	260	420

En las figuras 5.1.1 y 5.1.2 se presentan los cromatogramas obtenidos de la inyección de una mezcla estándar de 16 HAPs de 1 mg/L y 10 mg/L, respectivamente, con las condiciones instrumentales óptimas.

Cabe mencionar que los compuestos benzo[k]fluoranteno y benzo[a]pireno coeluyen en una misma señal en un tiempo de retención de 20.5 min.

El compuesto acenaftileno no presenta la propiedad de fluorescencia por lo que no se obtiene señal para este compuesto en el cromatograma CLAR-FL.

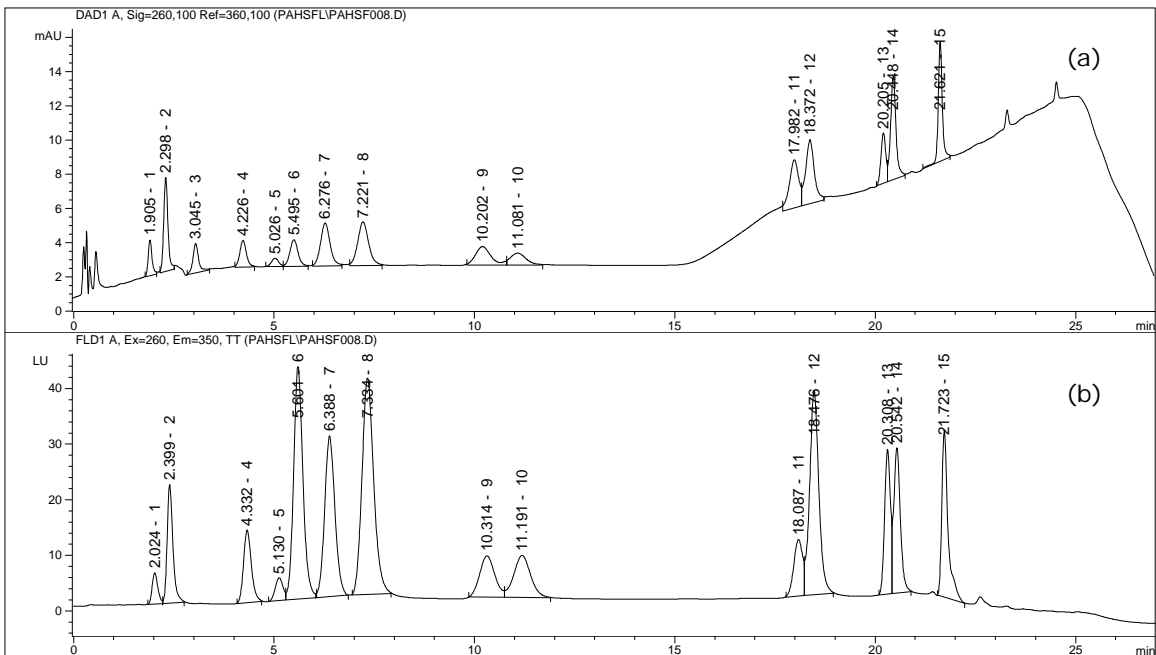


Figura 5.1.1. Cromatogramas de la inyección de una mezcla estándar de 16 HAPs por CLAR-UV (a) y CLAR-FL (b). Concentración aproximada 1 mg/L. Compuestos: (1) indeno, (2) naftaleno, (3)acenaftileno, (4)bifenilo, (5) acenafteno, (6) fluoreno, (7) fenantreno, (8) antraceno, (9) fluoranteno, (10) pireno, (11) criseno, (12) 1,2-benzantraceno, (13) benz[e]acefenantrileno, (14) benzo[k]fluoranteno y benzo[a]pireno, (15) 1,2:5,6-dibenzantraceno.

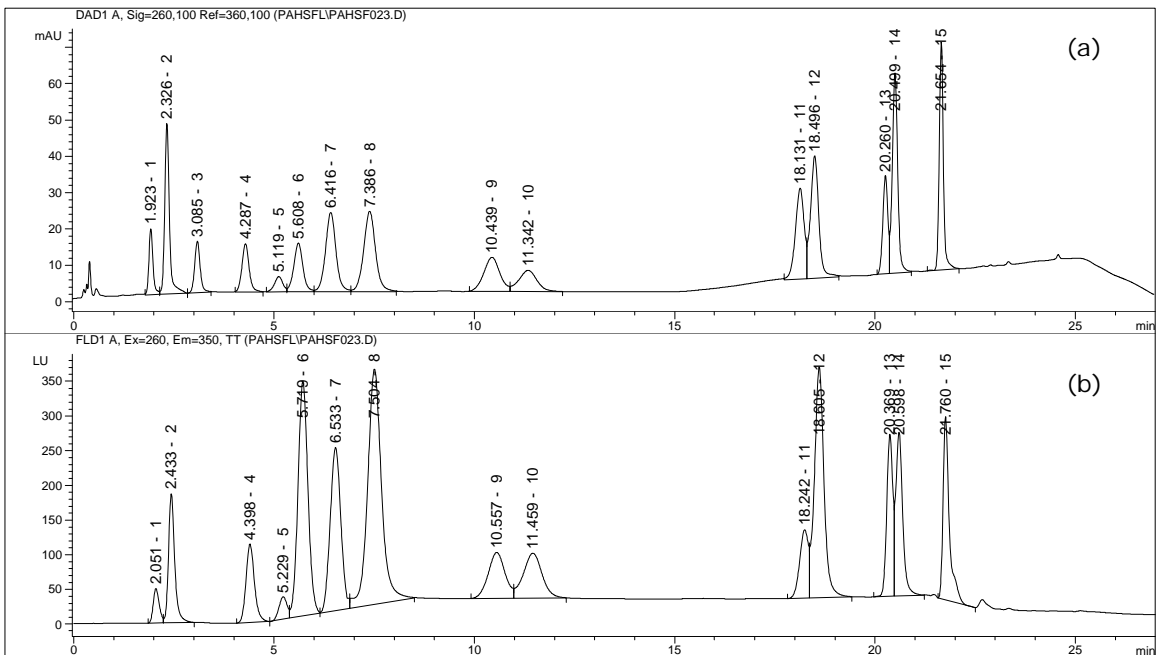


Figura 5.1.2. Cromatogramas de la inyección de una mezcla estándar de 16 HAPs por CLAR-UV (a) y CLAR-FL (b). Concentración aproximada 10 mg/L. Compuestos: (1) indeno, (2) naftaleno, (3)acenaftileno, (4)bifenilo, (5) acenafteno, (6) fluoreno, (7) fenantreno, (8) antraceno, (9) fluoranteno, (10) pireno, (11) criseno, (12) 1,2-benzantraceno, (13) enz[e]acefenantrileno, (14) benzo[k]fluoranteno y benzo[a]pireno, (15) 1,2:5,6-dibenzantraceno.

Los compuestos benzo[k]fluoranteno y benzo[a]pireno que coeluyen en la columna Atlantis™ dC18, 2.1 x 50 mm, 3 μm se lograron separar en una columna de dimensiones mayores (Whatman Partisil 5ODS, 4.6 x 250 mm, 5 μm) como puede observarse en el cromatograma de la figura 5.1.3, sin embargo, el tiempo de análisis es más del doble y por otro lado hay coelución de los compuestos acenafteno y fluoreno en la señal de 13.19 min además de una pérdida de resolución entre los picos de 28.52 y 29.46 min correspondientes a los compuestos criseno y 1,2-dibenzantraceno.

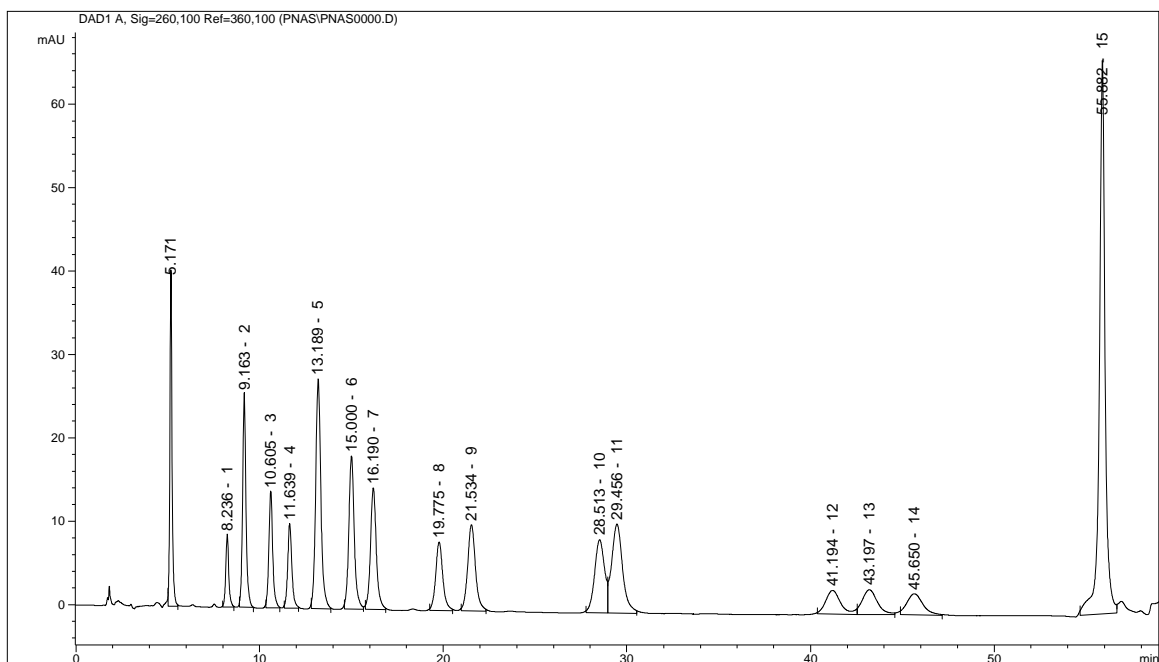


Figura 5.1.3. Cromatograma de la inyección de una mezcla estándar de 16 HAPs por CLAR-UV utilizando una columna Whatman Partisil 5ODS, 4.6 x 250 mm, 5 μm. Concentración aproximada 8 mg/L. Compuestos: (1) indeno, (2) naftaleno, (3)acenaftileno, (4)bifenilo, (5) acenafteno y fluoreno, (6) fenantreno, (7) antraceno, (8) fluoranteno, (9) pireno, (10) criseno, (11) 1,2-benzantraceno, (12) benz[e]acefenantrileno, (13) benzo[k]fluoranteno (14) benzo[a]pireno, (15) 1,2:5,6-dibenzantraceno.

De la inyección de la disolución madre de 16 HAPs a distintas longitudes de onda de absorción se obtuvieron los cromatogramas de la figura 5.1.4, en los que se observa que a una longitud de onda de 230 nm se tiene una buena respuesta para todos los compuestos.

A una longitud de onda de 275 nm los compuestos acenaftileno (pico No. 3) y antraceno (pico No. 8) presentan señal negativa, por otro lado los compuestos indeno (pico No. 1) y acenafteno (pico No. 5) tienen una respuesta muy baja.

A una longitud de onda de 254 nm el compuesto acenaftileno (pico No. 3) presenta señal negativa y no hay respuesta del compuesto acenafteno (pico No. 5), también puede observarse que hay pérdida de respuesta del último pico en comparación con las demás longitudes de onda estudiadas.

A una longitud de onda de 260 nm se obtiene la mejor respuesta de los compuestos estudiados.

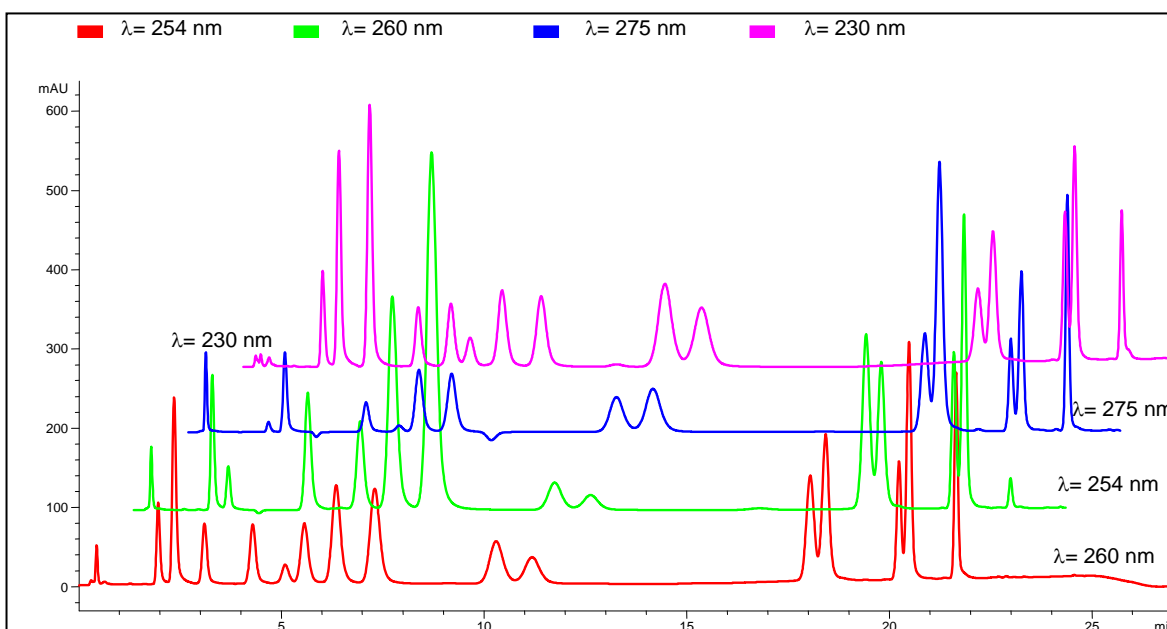


Figura 5.1.4. Cromatogramas obtenidos de la inyección de una mezcla estándar de 16 HAPs por CLAR-UV a distintas longitudes de onda. Concentración 50 mg/L.

En la figura 5.1.5 se presentan los cromatogramas obtenidos de la inyección de una disolución estándar de 16 HAPs de 10 mg/L a distintas longitudes de onda de emisión manteniendo la longitud de onda de excitación a 260 nm durante toda la corrida.

El primer cromatograma corresponde a la respuesta del detector UV.

El segundo cromatograma corresponde a la respuesta del detector de fluorescencia a una longitud de onda de emisión de 350 nm, en este cromatograma se observa que no

se tiene respuesta para los picos 3, 8, 9, 10, 13 y 14 y hay una baja respuesta de los picos 11, 12 y 15.

El tercer cromatograma corresponde a la respuesta del detector de fluorescencia a una longitud de onda de emisión de 420 nm a la cual no se tiene respuesta de los primeros 6 picos, pero hay un aumento en la respuesta de los últimos 5 picos.

El cuarto cromatograma corresponde a una longitud de onda de emisión de 440 nm, a esta longitud de onda se obtiene una buena respuesta de los picos que eluyen entre 7 y 19 minutos.

El último cromatograma corresponde a una longitud de onda de emisión de 500 nm en la que no se obtiene señal de los primeros 7 picos, ni de los picos 10 y 11 pero se tiene una adecuada respuesta de los picos 13 y 14.

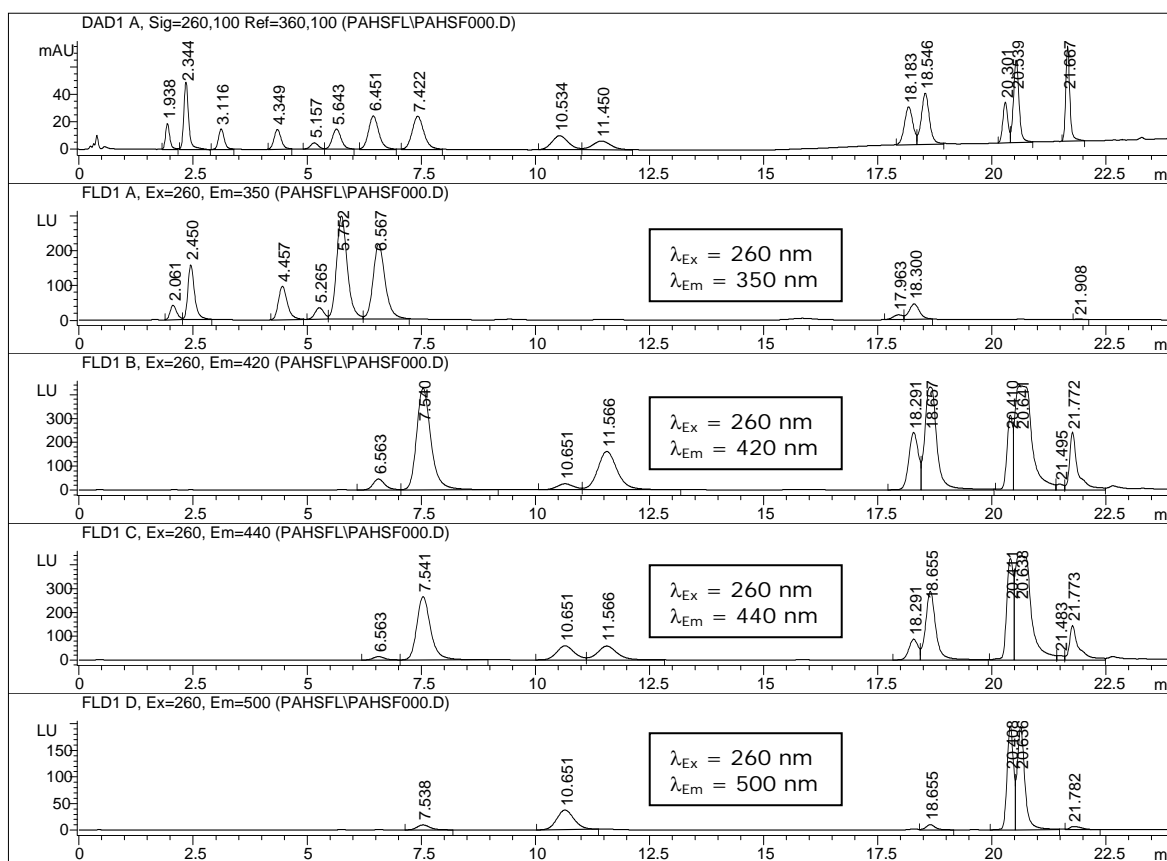


Figura 5.1.5. Cromatograma obtenido de la inyección de una mezcla estándar de 16 HAPs por CLAR-FL a distintas longitudes de onda de emisión. Concentración 10 mg/L.

De acuerdo a lo anterior se optimizó el programa de longitudes de onda de emisión de la siguiente forma:

De 0 a 7 minutos se eligió una longitud de onda de emisión de 350 nm.

De 7 a 19.5 minutos se trabajó a una longitud de onda de 440 nm.

Entre 19 y 21 minutos la longitud de onda de emisión se eligió en 500 nm debido a que se tiene menor respuesta de los picos que eluyen en 20.41 y 20.64 minutos en comparación con 420 y 440 nm y de esta manera se mejora la resolución de los picos.

Después del minuto 21 la longitud de onda de emisión se estableció en 420 nm debido a que se tiene la mayor respuesta del último pico, en comparación con las demás longitudes de onda de emisión trabajadas.

Con respecto a la separación de hidrox-HAPs por CLAR-UV-FL las condiciones instrumentales en las cuales se logró la mejor separación son las siguientes:

Volumen de inyección: 2 μ L

Fase móvil: A: Agua

B: Acetonitrilo

Gradiente de elución:

Tiempo (min)	0	9	10	12	13	14
% B	40	40	100	100	40	40

Flujo: 2.0 mL/min

Guarda columna C₁₈ (ODS Octadecyl) 3.0 x 4.0 mm

Columna: Chromolith Performance RP-18e, 4.6 x 100 mm

Temperatura de columna: 25°C

Detector UV: $\lambda = 260$ nm, $\lambda_{ref} = 360$ nm

Programa de longitudes de onda del detector de fluorescencia:

Tiempo (min)	Longitud de onda de excitación (nm)	Longitud de onda de emisión (nm)
0.0	230	380
1.9	230	430
3.0	230	410
6.0	230	455

Como se puede apreciar en las figuras 5.1.6 y 5.1.7 se obtiene una buena separación de los 5 metabolitos estudiados en un tiempo de análisis menor a 8 minutos.

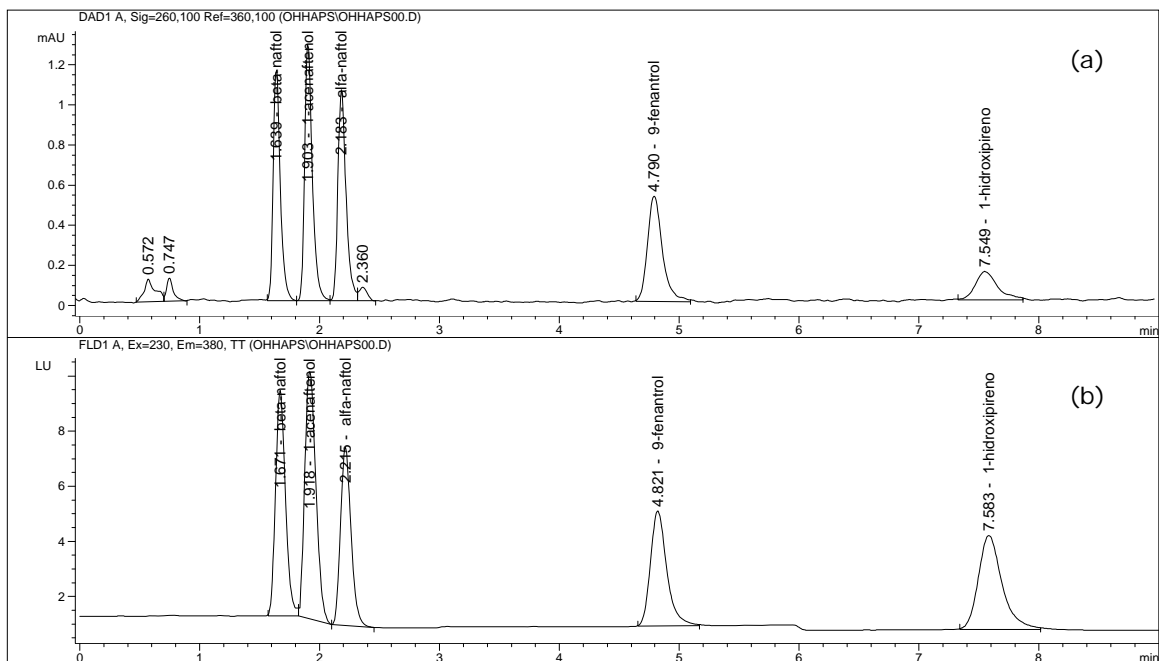


Figura 5.1.6. Cromatogramas obtenidos de la inyección de una mezcla estándar de 5 Hidroxi-HAPs por CLAR-UV (a) y CLAR-FL (b). Concentración aproximada 1 mg/L.

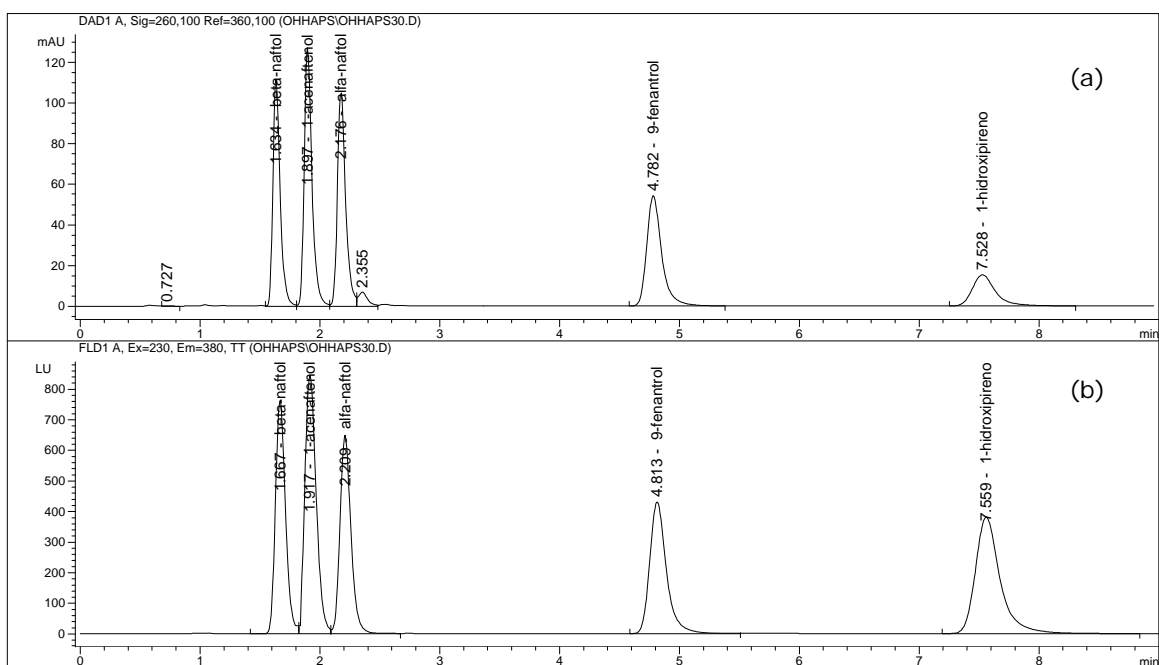


Figura 5.1.7. Cromatogramas obtenidos de la inyección de una mezcla estándar de 5 Hidroxi-HAPs por CLAR-UV (a) y CLAR-FL (b). Concentración aproximada 100 mg/L.

5.2 Evaluación de parámetros cromatográficos

El tiempo muerto de la columna con la que se obtuvo la mejor separación de los HAPs (Atlantis™ dC18, 2.1 x 50 mm, 3 μm) fue determinado por inyección de 3 μL de una disolución de nitrato de potasio de 1.1 mg/mL, obteniéndose un tiempo de 0.312 minutos.

Considerando este valor de tiempo muerto se calcularon los valores de k' y α de todas las inyecciones realizadas, cabe mencionar que los valores obtenidos tanto de k' como de α son estimados debido a que el valor de tiempo muerto obtenido para todo el sistema es muy alto (el volumen muerto de la columna correspondería al 80% de la columna vacía, lo cual es imposible). Esto puede explicarse por el volumen contenido en la tubería entre la válvula de inyección y la cabeza de la columna y entre la salida de la columna y el detector, el cual no ha sido considerado para el cálculo de volumen muerto.

En la tabla 5.2.1 se presentan los parámetros cromatográficos obtenidos con los resultados de integración de los cromatogramas de la figura 5.1.2.

Tabla 5.2.1. Parámetros cromatográficos calculados para 16 HAPs. Analizados por CLAR-UV (a) y por CLAR-FL (b)

(a)

Pico	k'	H (m)	Rs	α	$W_{(1/2)}$ (min)
1	5.17	2.5×10^{-5}			0.10
2	6.45	2.2×10^{-5}	Rs _(1,2) 2.17	$\alpha_{(1,2)}$ 1.25	0.11
3	8.89	1.8×10^{-5}	Rs _(2,3) 3.50	$\alpha_{(2,3)}$ 1.38	0.14
4	12.74	1.7×10^{-5}	Rs _(3,4) 4.35	$\alpha_{(3,4)}$ 1.43	0.18
5	15.41	1.7×10^{-5}	Rs _(4,5) 2.41	$\alpha_{(4,5)}$ 1.21	0.22
6	16.97	1.6×10^{-5}	Rs _(5,6) 1.25	$\alpha_{(5,6)}$ 1.10	0.24
7	19.57	1.6×10^{-5}	Rs _(6,7) 1.88	$\alpha_{(6,7)}$ 1.15	0.27
8	22.67	1.5×10^{-5}	Rs _(7,8) 1.99	$\alpha_{(7,8)}$ 1.16	0.30
9	32.46	1.5×10^{-5}	Rs _(8,9) 4.91	$\alpha_{(8,9)}$ 1.43	0.43
10	35.35	1.6×10^{-5}	Rs _(9,10) 1.17	$\alpha_{(9,10)}$ 1.09	0.48
11	57.11	*	Rs _(10,11) 10.95	$\alpha_{(10,11)}$ 1.62	0.24
12	58.28	*	Rs _(11,12) 0.94	$\alpha_{(11,12)}$ 1.02	0.21
13	63.94	*	Rs _(12,13) 5.87	$\alpha_{(12,13)}$ 1.10	0.14
14	64.70	*	Rs _(13,14) 1.00	$\alpha_{(13,14)}$ 1.01	0.14
15	68.40	*	Rs _(14,15) 5.56	$\alpha_{(14,15)}$ 1.06	0.10

(b)

Pico	k'	H (m)	Rs	α	$W_{(1/2)}$ (min)
1	5.57	5.5×10^{-5}			0.16
2	6.80	3.6×10^{-5}	Rs _(1,2) 1.42	$\alpha_{(1,2)}$ 1.22	0.15
4	13.10	2.2×10^{-5}	Rs _(2,4) 6.19	$\alpha_{(2,4)}$ 1.93	0.22
5	15.76	2.4×10^{-5}	Rs _(4,5) 1.99	$\alpha_{(4,5)}$ 1.20	0.27
6	17.33	1.9×10^{-5}	Rs _(5,6) 1.07	$\alpha_{(5,6)}$ 1.10	0.26
7	19.94	1.7×10^{-5}	Rs _(6,7) 1.74	$\alpha_{(6,7)}$ 1.15	0.28
8	23.05	1.9×10^{-5}	Rs _(7,8) 1.82	$\alpha_{(7,8)}$ 1.16	0.34
9	32.84	1.6×10^{-5}	Rs _(8,9) 4.54	$\alpha_{(8,9)}$ 1.42	0.45
10	35.73	1.7×10^{-5}	Rs _(9,10) 1.13	$\alpha_{(9,10)}$ 1.09	0.49
11	57.47	*	Rs _(10,11) 10.65	$\alpha_{(10,11)}$ 1.61	0.25
12	58.63	*	Rs _(11,12) 0.86	$\alpha_{(11,12)}$ 1.02	0.24
13	64.28	*	Rs _(12,13) 4.72	$\alpha_{(12,13)}$ 1.10	0.20
14	65.02	*	Rs _(13,14) 0.67	$\alpha_{(13,14)}$ 1.01	0.21
15	68.74	*	Rs _(14,15) 3.90	$\alpha_{(14,15)}$ 1.06	0.14

* Para estos picos no se calculó el valor de H debido a que estos compuestos eluyen en condiciones de gradiente.

El valor de k' óptimo para el desarrollo de un método analítico robusto requiere que se encuentre entre $2 < k' < 10$ para asegurar que exista interacción del analito con la fase estacionaria. Los valores de factor de capacidad obtenidos aunque son aproximados son lo suficientemente altos para asegurar que sí hay una buena interacción de los analitos con la fase estacionaria.

Los valores de altura equivalente a un plato teórico indican que la columna separa eficientemente los compuestos, pues los valores que se obtienen son lo suficientemente pequeños y por consiguiente el valor de N es mucho mayor.

Los valores de selectividad en todos los casos se encuentran entre $1 \leq \alpha \leq 2$ que son valores de trabajo adecuados.

Los valores de Rs para varios picos se encuentran por debajo de 1.5 que es el valor adecuado para un buen análisis cuantitativo, sin embargo en muestras de orina reales se espera tener un gran número de isómeros de HAPs que no podrían separarse con estas condiciones cromatográficas, pero que podrían cuantificarse por grupos de acuerdo al número de anillos aromáticos presentes.

Los parámetros cromatográficos calculados para los hidrox-HAPs se presentan en la tabla 5.2.2, los cuales fueron calculados con los resultados de integración de los cromatogramas de la figura 5.1.7

El tiempo muerto de la columna con la que se obtuvo la mejor separación de los hidrox-HAPs (Chromolith Performance RP-18e, 4.6 x 100 mm) fue determinado por inyección de 2 µL de una disolución de nitrato de potasio 1.1 mg/mL obteniéndose un tiempo de 0.73 minutos. Nuevamente, el valor de tiempo muerto es muy grande de acuerdo a la capacidad de la columna que es de 1.7 mL. Cabe mencionar que en este caso se trata de una columna de tipo monolítica, en la cual los espacios intersticiales dentro de ella son muy grandes, lo anterior aunado al volumen en la tubería y a la presencia de un guarda columna resulta en valores de k' y α aproximados.

Por otro lado los valores de R_s y H son correctos puesto que para su cálculo no se requiere del valor de tiempo muerto (*ver ecuaciones en la sección 4.7*)

En este caso sí se calcularon los valores de H para todos los compuestos ya que eluyen en condiciones isocráticas y los valores obtenidos son del orden de 10^{-5} m lo que indica una buena eficiencia en la separación de estos compuestos.

Los valores de R_s en todos los casos son mayores a 1.5 lo cual indica que hay una completa separación entre los picos cromatográficos.

Tabla 5.2.2. Parámetros cromatográficos calculados para 5 Hidrox-HAPs. Analizados por CLAR-UV (a) y por CLAR-FL (b)

(a)

Pico	k'	H (m)	R_s	α	$W_{(1/2)}$ (min)
1	1.23	2.5×10^{-5}			0.06
2	1.59	2.2×10^{-5}	$R_s_{(1,2)}$ 2.42	$\alpha_{(1,2)}$ 1.29	0.06
3	1.98	1.9×10^{-5}	$R_s_{(2,3)}$ 2.40	$\alpha_{(2,3)}$ 1.24	0.07
4	5.54	1.2×10^{-5}	$R_s_{(3,4)}$ 14.37	$\alpha_{(3,4)}$ 2.80	0.12
5	9.30	1.2×10^{-5}	$R_s_{(4,5)}$ 10.15	$\alpha_{(4,5)}$ 1.68	0.19

(b)

Pico	k'	H (m)	R_s	α	$W_{(1/2)}$ (min)
1	1.28	5.1×10^{-5}			0.09
2	1.62	5.1×10^{-5}	$R_s_{(1,2)}$ 1.54	$\alpha_{(1,2)}$ 1.27	0.1
3	2.02	3.3×10^{-5}	$R_s_{(2,3)}$ 1.75	$\alpha_{(2,3)}$ 1.25	0.09
4	5.58	1.5×10^{-5}	$R_s_{(3,4)}$ 13.06	$\alpha_{(3,4)}$ 2.76	0.14
5	9.34	1.3×10^{-5}	$R_s_{(4,5)}$ 9.47	$\alpha_{(4,5)}$ 1.67	0.2

5.3 Optimización de las condiciones de extracción en fase sólida para la recuperación de los metabolitos en muestras de orina.

Los resultados de recobro obtenidos al variar los disolventes de acondicionamiento, lavado y elución de los cartuchos de extracción en fase sólida se presentan en la tabla 5.3.1.

Tabla 5.3.1. Recobro de metabolitos en 3 muestras de orina sometidas a SPE bajo 3 condiciones de extracción distintas.

<i>Compuesto</i> *	<i>Condiciones 1</i> **		<i>Condiciones 2</i> ***		<i>Condiciones 3</i> ****	
	<i>% Recobro (UV)</i>	<i>% Recobro (FL)</i>	<i>% Recobro (UV)</i>	<i>% Recobro (FL)</i>	<i>% Recobro (UV)</i>	<i>% Recobro (FL)</i>
β-naftol	77.97	81.97	62.37	74.64	77.83	80.65
1-acenaftenol	74.62	60.88	75.57	112.80	75.31	60.03
α-naftol	67.99	72.01	67.89	73.13	68.60	71.96
9-fenantrol	49.32	53.85	52.80	57.65	52.37	56.40
1-hidroxi pireno	24.44	25.62	42.03	44.04	32.37	33.67

* Presentados de acuerdo al orden de elución en el cromatograma

** Acondicionamiento: ACN, lavado: H₂O/ACN(90:10), elución: ACN

*** Acondicionamiento: ACN, lavado: H₂O/ACN(90:10), elución: CH₂Cl₂/AcEt (50:50)

**** Acondicionamiento: MeOH y H₂O, lavado: H₂O/ACN(90:10), elución: ACN

Como se puede observar en la tabla de resultados anterior, el compuesto 1-hidroxi pireno es el que presenta los valores de recobro menores en todas las condiciones de extracción. El compuesto 9-fenantrol presenta los valores más bajos de recobro en las condiciones 1 y los más altos en las condiciones No. 2. El compuesto α-naftol presenta valores de recobro similares en todas las condiciones de extracción. En el caso del compuesto 1-acenaftenol las diferencias en los valores de recobro sí son significativamente diferentes sobre todo en las condiciones No. 2 en donde se obtiene un % de recobro por fluorescencia de 112.8%, esto se puede explicar por la dificultad de integrar el pico cromatográfico debido al programa de longitudes de onda de emisión, ya que precisamente en el tiempo en que comienza a eluir el pico del 1-acenaftenol hay un cambio en la longitud de onda de emisión y esto provoca una perturbación de la línea base y por lo tanto una variación en el valor de área. El

compuesto β -naftol presenta valores de recobro más dispersos a las distintas condiciones de extracción, siendo el valor más bajo de 62.37% y el más alto de 81.97%.

En base a los resultados de este estudio se consideraron las condiciones No. 3 como las condiciones óptimas de extracción, por lo que se propone acondicionar los cartuchos con 5 mL de metanol y 10 mL de agua, adicionar 10 mL de muestra, lavar el cartucho con 10 mL de una mezcla agua/acetonitrilo 90:10 y eluir los analitos con 5 mL de acetonitrilo.

Con estas condiciones de extracción se trataron 3 muestras de orina y se evaluó el recobro (*tabla 5.3.2*) de acuerdo a la siguiente relación:

$$\%R = \frac{C_{calculada}}{C_{real}} * 100$$

En donde la concentración calculada se obtuvo por medio de la siguiente ecuación, donde A es el área promedio obtenida de la inyección por triplicado de la muestra, b y m, respectivamente, corresponden a la ordenada al origen y la pendiente de la curva de calibración de método.

$$C_{calculada} = \frac{A - b}{m}$$

La concentración real se obtiene de considerar que cada muestra se fortificó con 835 μ L de la disolución estándar de hidroxil-HAPs de aproximadamente 10 μ g/mL, llevando al aforo a 10 mL con orina.

Tabla 5.3.2. Recobro de metabolitos en 3 muestras de orina tratadas en las condiciones óptimas de extracción en fase sólida.

<i>Compuesto</i>	<i>UV</i>		<i>FL</i>	
	<i>%Recobro*</i>	<i>CV(%)</i>	<i>% Recobro*</i>	<i>CV(%)</i>
β -naftol	68.65	12.78	73.85	12.26
1-acenaftenol	78.67	16.32	80.67	16.62
α -naftol	104.21	14.22	110.21	14.39
9-fenantrol	92.37	5.69	101.68	5.48
1-hidroxipireno	58.79	5.07	64.02	4.72

* *Valores promedio obtenidos de 3 muestras de orina diferentes.*

Los porcentajes de recobro promedio de los ensayos realizados oscilan entre 59% y 110% obteniéndose los valores más bajos para el compuesto 1-hidroxipireno con un recobro de 58.79% por UV y 64.02% por fluorescencia y los más altos para el compuesto α -naftol con un recobro de 104.21% por UV y 110.21% por fluorescencia. Según los criterios de aceptación establecidos por la EPA (www.accustandard.com/asi/epa) los porcentajes de recobro deben encontrarse en un intervalo entre 60 y 120 %; de acuerdo a este criterio, los compuestos β -naftol, 1-acenaftenol, α -naftol y 9-fenantrol cumplen con este criterio, no así el compuesto 1-hidroxipireno para el cual se obtiene un recobro promedio por UV de 58.79%.

Cabe mencionar que los recobros presentados en la tabla 5.3.2 son significativamente mayores que los presentados en la tabla 5.3.1 en las condiciones No. 3 esto se debe a que los recobros de la tabla 5.3.2 fueron calculados considerando los valores de pendiente y ordenada al origen de las curvas de calibración de método de cada analito (datos de las tablas 5.4.1.9 – 5.4.1.13), mientras que los recobros presentados en la tabla 5.3.1 fueron calculados con los valores de pendiente y ordenada al origen de las curvas de calibración instrumental de cada analito (datos de las tablas 5.4.1.4 y 5.4.1.5); de modo que los recobros referidos a la curva de calibración de método mejoran debido a que se tiene un efecto de la matriz tanto en la curva de calibración como en las muestras M1, M2 y M3 aunque cabe mencionar que la curva de calibración se realizó con una muestra de orina diferente a la muestras M1, M2 y M3.

Los cromatogramas correspondientes a las 3 muestras de orina tratadas en las condiciones óptimas de extracción se presentan en el apéndice 2, figuras A2-19, A2-20 y A2-21.

5.4 Evaluación de parámetros de validación

5.4.1 Linealidad

Linealidad del sistema

Se obtuvieron las curvas de calibración para cada uno de los HAPs por CLAR-UV en el intervalo de concentración de 0.5 – 50 mg/L. En la figura 5.4.1.1 se muestra la gráfica global del comportamiento lineal de cada compuesto.

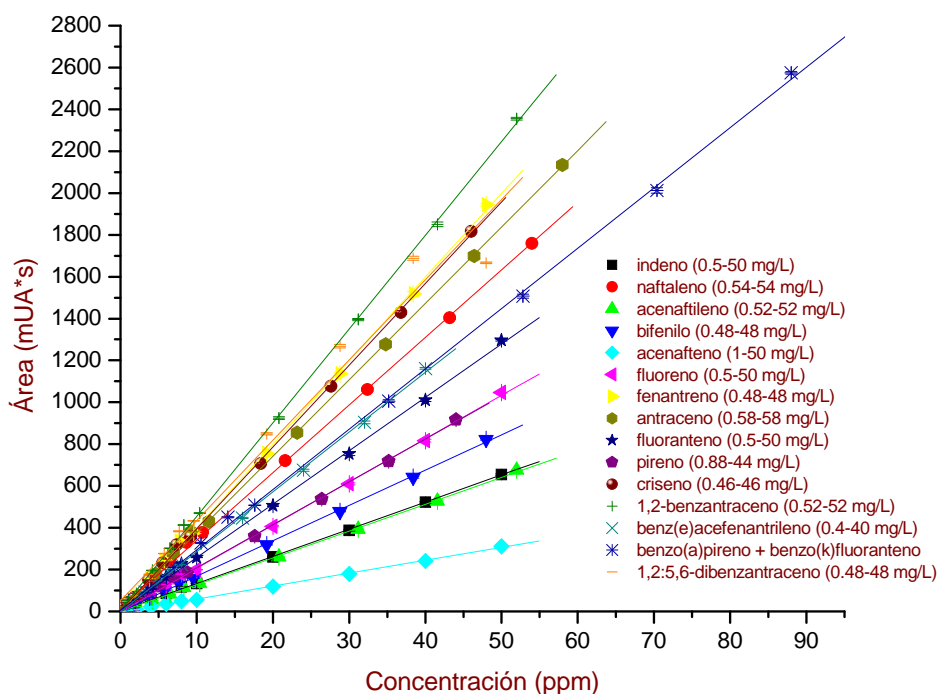


Figura 5.4.1.1. Curvas de calibración de 16 HAPs obtenidas por CLAR-UV.

Tabla 5.4.1.1. Valores de regresión lineal de las curvas de calibración de 16 HAPs por CLAR-UV (área vs concentración).

<i>Compuesto</i> *	<i>Ordenada</i>	<i>Pendiente</i>	<i>r</i>
Indeno	3.23	12.98	0.9998
Naftaleno	16.68	32.33	0.9996
Acenaftileno	-0.51	12.82	0.9997
Bifenilo	-0.12	16.90	0.9997
Acenafteno	-2.38	6.17	0.9997

Fluoreno	-0.51	20.65	0.9997
Fenantreno	1.53	39.93	0.9997
Antraceno	9.93	36.56	0.9998
Fluoranteno	3.04	25.50	0.9996
Pireno	3.88	20.51	0.9997
Criseno	4.99	39.05	0.9998
1,2-benzantraceno	6.86	44.77	0.9998
Benz[e]acefenantrileno	-0.13	28.59	0.9997
Benzo[a]pireno	**	**	**
Benzo[k]fluoranteno	**	**	**
1,2:5,6-dibenzantraceno	11.47	43.76	0.9996

* Presentados de acuerdo al orden de elución en el cromatograma

** No se reportan debido a que los compuestos coeluyen

Por CLAR-FL se obtuvieron las curvas de calibración para cada uno de los HAPs en el intervalo de concentración de 0.5 – 10 mg/L. En la figura 5.4.1.2 se muestra la gráfica global del comportamiento lineal de cada compuesto.

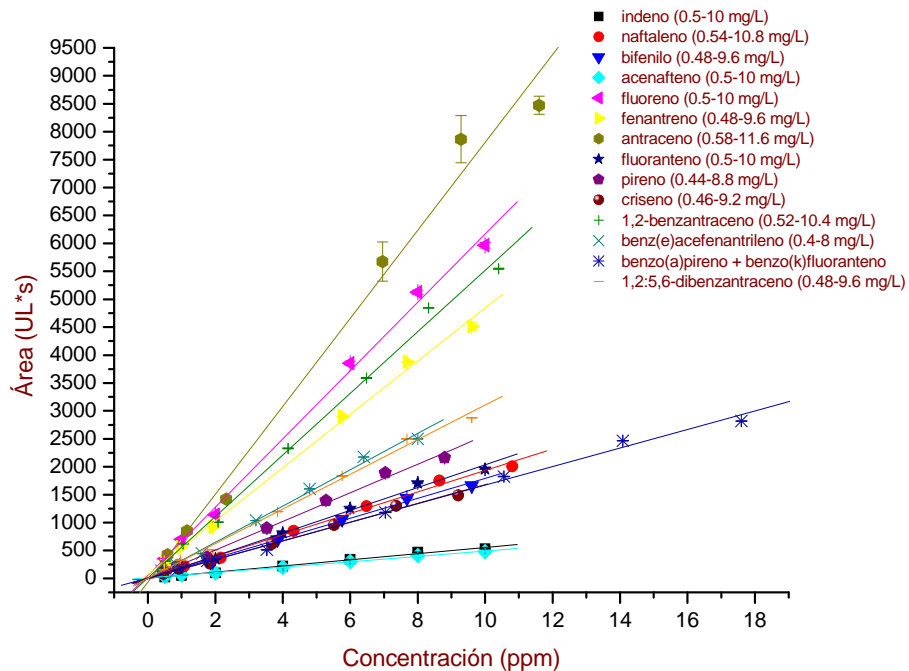


Figura 5.4.1.2. Curvas de calibración de 16 HAPs obtenidas por CLAR-FL.

Tabla 5.4.1.2. Valores de regresión lineal de las curvas de calibración de 16 HAPs por CLAR-FL (área vs concentración)

<i>Compuesto</i> *	<i>Ordenada</i>	<i>Pendiente</i>	<i>r</i>
Indeno	0.29	65.19	0.9967
Naftaleno	9.46	192.38	0.9975
Bifenilo	5.41	178.67	0.9978
Acenafteno	9.07	48.04	0.9988
Fluoreno	54.84	610.47	0.9981
Fenantreno	74.66	477.05	0.9985
Antraceno	-68.98	767.55	0.9930
Fluoranteno	-4.05	203.80	0.9974
Pireno	-3.62	256.12	0.9972
Criseno	-0.87	168.17	0.9974
1,2-benzantraceno	7.29	551.26	0.9976
Benz[e]acefenantrileno	-1.66	324.58	0.9975
Benzo[a]pireno	**	**	**
Benzo[k]fluoranteno	**	**	**
1,2:5,6-dibenzantraceno	2.45	310.32	0.9976

* Presentados de acuerdo al orden de elución en el cromatograma

** No se reportan debido a que los compuestos coeluyen

Los resultados de la regresión lineal de las curvas de calibración de los HAPs muestran que varios compuestos presentan un valor de ordenada al origen negativo, lo cual se explica por la dispersión de los datos en las disoluciones de alta concentración. Por otro lado los valores de pendiente indican que en general se tiene una buena sensibilidad para todos los compuestos, siendo el acenafteno el compuesto que presenta las peores condiciones de sensibilidad ya que las pendientes de sus curvas de calibración son de apenas 6.17 por UV y 48 por FL.

Los resultados de coeficiente de correlación obtenidos por CLAR-UV son satisfactorios para todos los compuestos estudiados (valores de $r > 0.999$) en el intervalo de concentración de 0.5 a 50 mg/L.

Por CLAR-FL también se obtienen resultados satisfactorios de coeficiente de correlación para todos los compuestos estudiados ($r > 0.99$) en el intervalo de concentración de 0.5 – 10 mg/L.

En los cromatogramas obtenidos con el detector de fluorescencia (*figuras 5.1.1 (b) y 5.1.2 (b)*) como consecuencia del programa de longitudes de onda de emisión, la línea base presenta variaciones, lo que dificulta la integración de los picos, por este motivo se graficaron las alturas de los picos en lugar del área en función de la concentración, (*figura 5.4.1.3*).

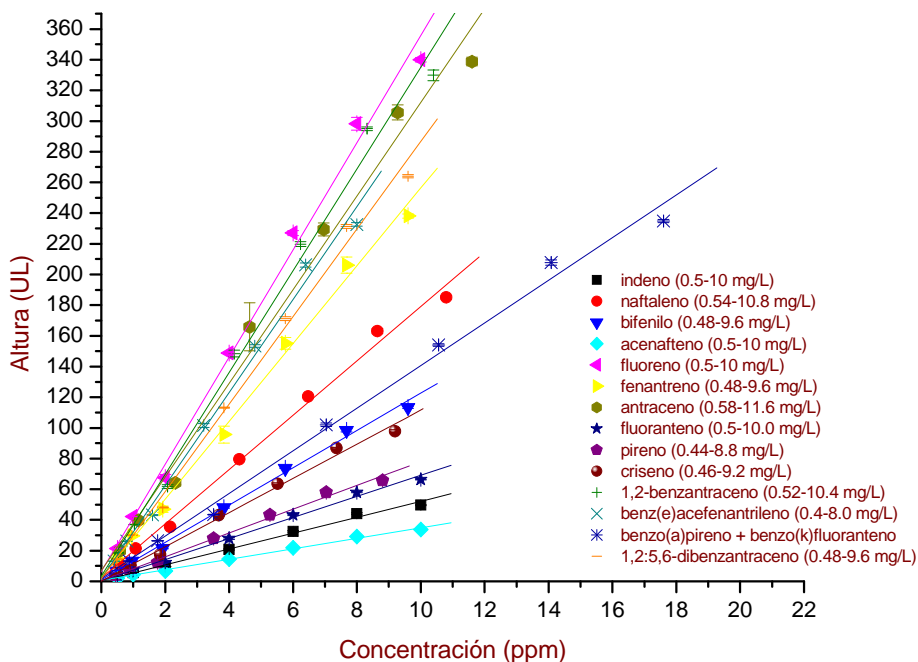


Figura 5.4.1.3. Curvas de calibración de 16 HAPs obtenidas por CLAR-FL.

Tabla 5.4.1.3. Valores de regresión lineal de las curvas de calibración de 16 HAPs por CLAR-FL (altura vs concentración).

<i>Compuesto</i> *	<i>Ordenada</i>	<i>Pendiente</i>	<i>r</i>
Indeno	0.35	5.17	0.9966
Naftaleno	1.93	17.71	0.9971
Bifenilo	1.04	12.16	0.9976
Acenafteno	0.67	3.42	0.9981
Fluoreno	6.42	34.93	0.9969
Fenantreno	2.81	25.35	0.9976
Antraceno	6.89	30.52	0.9933
Fluoranteno	0.42	6.86	0.9972
Pireno	0.53	7.75	0.9969
Criseno	0.23	11.14	0.9962

1,2-benzantraceno	2.82	33.05	0.9961
Benz[e]acefenantrileno	1.73	30.32	0.9964
Benzo[a]pireno	**	**	**
Benzo[k]fluoranteno	**	**	**
1,2:5,6-dibenzantraceno	1.40	28.53	0.9971

* Presentados de acuerdo al orden de elución en el cromatograma

** No se reportan debido a que los compuestos coeluyen

En comparación con los resultados obtenidos graficando área vs concentración, se obtienen valores de ordenada al origen en todos los casos positivos y el valor de la pendiente disminuye considerablemente, los valores de r se mantienen ($r > 0.99$).

Curvas de calibración de hidroxí-HAPs

Por CLAR-UV se obtuvieron las curvas de calibración área vs concentración para cada uno de los hidroxí-HAPs en el intervalo de concentración de 0.1-100 mg/L. En la figura 5.4.1.4 se muestra la gráfica global del comportamiento lineal de cada compuesto.

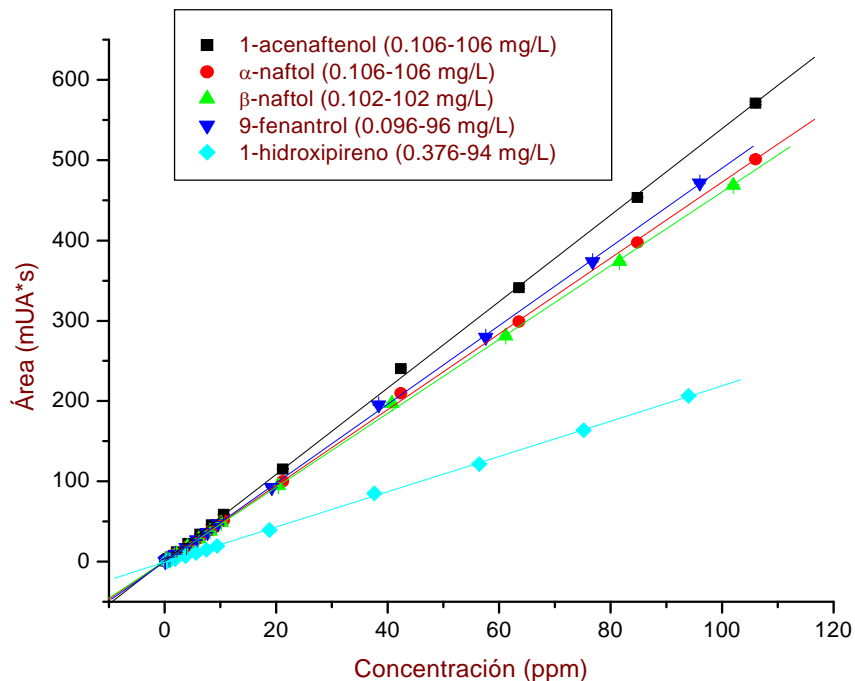


Figura 5.4.1.4. Curvas de calibración de 5 hidroxí-HAPs obtenidas por CLAR-UV.

Tabla 5.4.1.4. Valores de regresión lineal de las curvas de calibración de 5 hidroxi-HAPs por CLAR-UV (área vs concentración)

<i>Compuesto</i> *	<i>Ordenada</i>	<i>Pendiente</i>	<i>r</i>
β-naftol	0.69	4.60	0.9999
1-acenaftenol	0.83	5.38	0.9998
α-naftol	0.39	4.72	0.9999
9-fenantrol	-0.22	4.90	0.9999
1-hidroxipireno	-0.92	2.20	0.9999

* Presentados de acuerdo al orden de elución en el cromatograma

Por CLAR-FL se obtuvieron las curvas de calibración área vs concentración para cada uno de los hidroxi-HAPs en el intervalo de concentración de 0.1–100 mg/L. En la figura 5.4.1.5 se muestra la gráfica global del comportamiento lineal de cada compuesto.

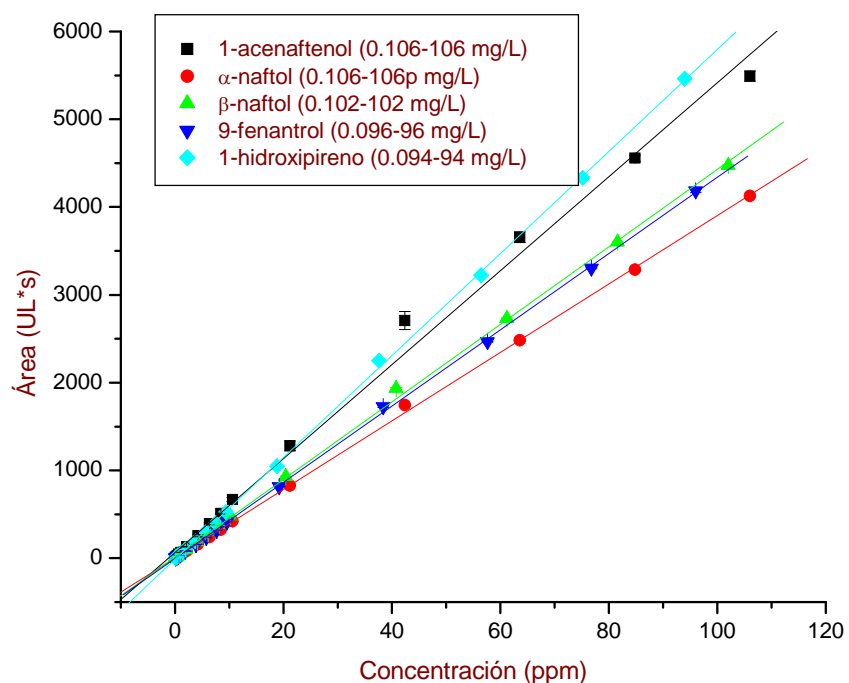


Figura 5.4.1.5. Curvas de calibración de 5 hidroxi-HAPs obtenidas por CLAR-FL.

Tabla 5.4.1.5 Valores de regresión lineal de las curvas de calibración de 5 hidroxi-HAPs por CLAR-FL (área vs concentración).

<i>Compuesto</i>	<i>Ordenada</i>	<i>Pendiente</i>	<i>r</i>
β-naftol	16.59	44.12	0.9997

1-acenafténol	64.45	53.50	0.9972
α -naftol	3.16	39.01	0.9998
9-fenantrol	-4.12	43.44	0.9999
1-hidroxipireno	-14.66	58.09	0.9999

En el apéndice 2 (figuras A2-1 a A2-10) se muestran los cromatogramas de las inyecciones de las disoluciones estándar de hidroxí-HAPs en el intervalo de concentración de 0.1 – 80 mg/L.

Al inyectar las disoluciones de hidroxí-HAPs de concentración de 0.01 – 0.1 mg/L se obtuvieron las curvas de calibración de las figuras 5.4.1.6 y 5.4.1.7.

Por UV únicamente los compuestos 1-acenafténol, α -naftol, y β -naftol presentan señal a partir de 0.02 mg/L.

El compuesto 9-fenantrol presenta señal en UV a partir de 0.06 mg/L por lo que no se construyó la gráfica correspondiente a este compuesto por no tenerse un mínimo de 3 puntos.

El compuesto 1-hidroxipireno no presenta señal en UV en el intervalo de concentración de 0.01 – 0.1 mg/L.

Por FL sí se obtiene señal para todos los compuestos en el intervalo de concentración de 0.01 – 0.1 mg/L.

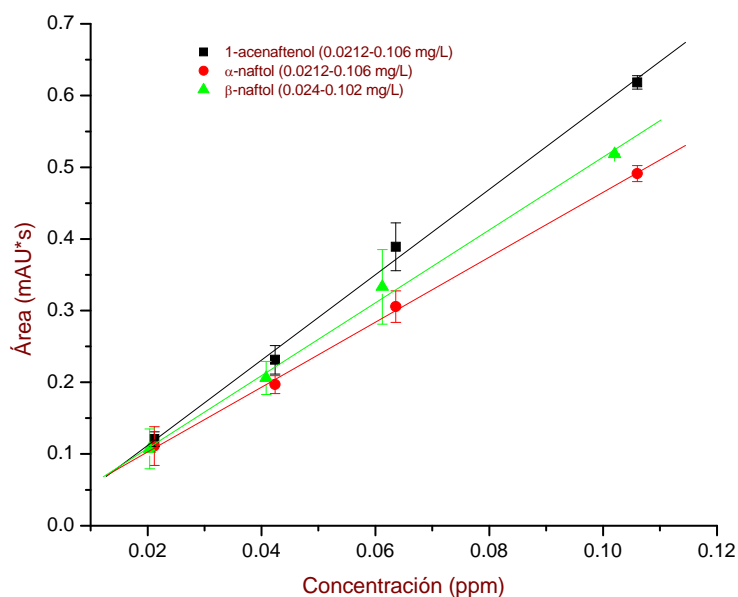


Figura 5.4.1.6 Curvas de calibración de 3 hidroxí-HAPs obtenidas por CLAR-UV.

Tabla 5.4.1.6 Valores de regresión lineal de las curvas de calibración de 3 hidroxi-HAPs por CLAR-UV (área vs concentración).

<i>Compuesto</i>	<i>Ordenada</i>	<i>Pendiente</i>	<i>r</i>
β-naftol	0.0061	5.0804	0.9981
1-acenaftanol	-0.0070	5.9502	0.9981
α-naftol	0.0122	4.5268	0.9994

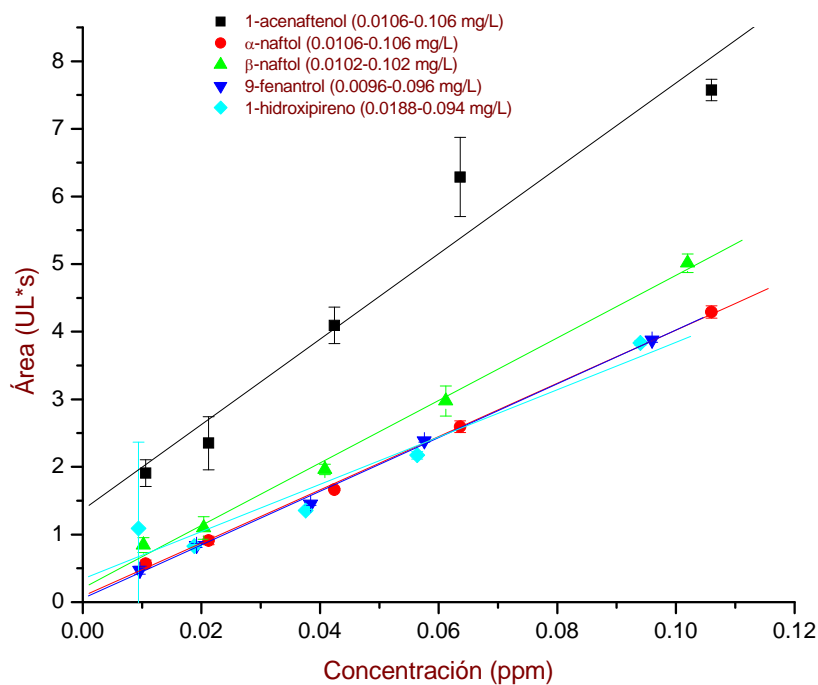


Figura 5.4.1.7. Curvas de calibración de 5 hidroxi-HAPs obtenidas por CLAR-FL.

Tabla 5.4.1.7. Valores de regresión lineal de las curvas de calibración de 5 hidroxi-HAPs por CLAR-FL (área vs concentración).

<i>Compuesto</i>	<i>Ordenada</i>	<i>Pendiente</i>	<i>r</i>
β-naftol	0.21	46.25	0.9974
1-acenaftanol	1.36	63.14	0.9748
α-naftol	0.09	39.37	0.9992
9-fenantrol	0.05	39.73	0.9986
1-hidroxipireno	-0.05	40.70	0.9963

Se obtuvieron las curvas de calibración altura vs concentración para cada uno de los hidroxi-HAPs en el intervalo de concentración de 0.01 – 0.1 mg/L. En la figura 5.3.1.8 se muestra la gráfica global del comportamiento lineal de cada compuesto.

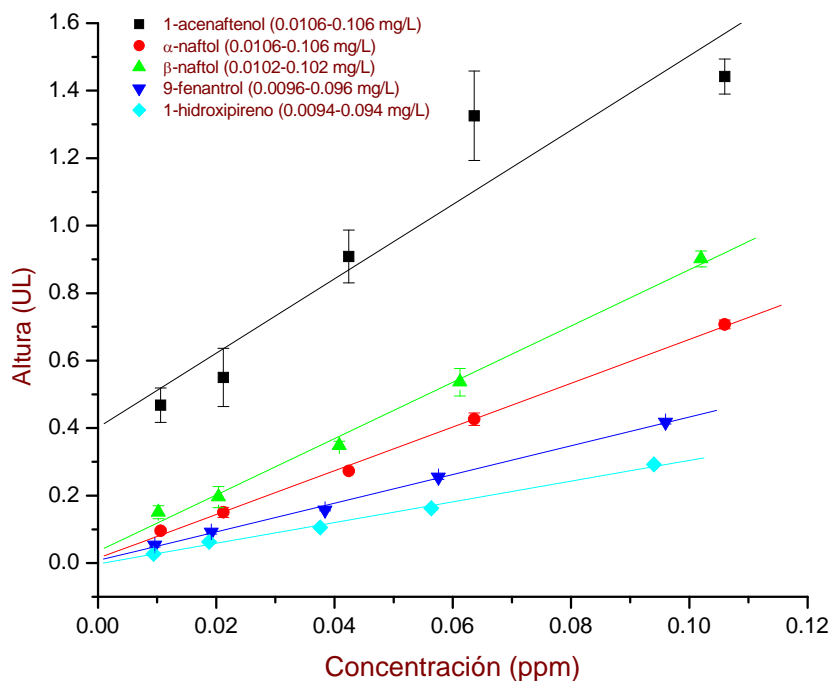


Figura 5.4.1.8. Curvas de calibración de 5 hidroxi-HAPs obtenidas por CLAR-FL.

Tabla 5.4.1.8. Valores de regresión lineal de las curvas de calibración de 5 hidroxi-HAPs por CLAR-FL (altura vs concentración).

<i>Compuesto</i>	<i>Ordenada</i>	<i>Pendiente</i>	<i>r</i>
β-naftol	0.03	8.34	0.9972
1-acenaftol	0.40	11.02	0.9488
α-naftol	0.01	6.48	0.9991
9-fenantrol	0.01	4.25	0.9988
1-hidroxipireno	-0.003	3.07	0.9973

En el intervalo de concentración de 0.1 – 100 mg/L por CLAR-UV se obtienen coeficientes de correlación excelentes ($r > 0.9999$) para los metabolitos β-naftol, α-naftol, 9-fenantrol y 1-hidroxipireno y 0.9998 para el metabolito 1-acenaftol. En el caso de CLAR-FL en este intervalo de concentración se obtienen resultados de

coeficientes de correlación > 0.9999 para los compuestos 9-fenantrol y 1-hidroxipireno y > 0.999 para los compuestos β -naftol y α -naftol, para el compuesto 1-acenaftenol se obtiene un coeficiente de correlación de 0.9972.

En el intervalo de 0.01 – 0.1 mg/L los coeficientes de correlación de los 3 compuestos detectados por UV son mayores a 0.99, por fluorescencia los coeficientes de correlación de los 5 metabolitos son mayores a 0.99 excepto para el compuesto 1-acenaftenol que es de 0.9748.

Cabe mencionar que el compuesto 1-acenaftenol presenta los coeficientes de correlación más bajos en las curvas de calibración obtenidas por CLAR-FL, lo observado es explicable por el hecho de que este compuesto eluye en un tiempo de 1.95 minutos, tiempo en el que hay un cambio en la longitud de onda de emisión de 380 nm a 430 nm y por consiguiente hay una perturbación de la línea base, lo que dificulta la integración de este pico.

Linealidad del método

Se obtuvieron curvas de calibración para cada uno de los hidroxi-HAPs por CLAR-UV-FL en el intervalo de concentración de 0.1 – 1.0 mg/L. Las figuras 5.4.1.9 a 5.4.1.13 muestran el comportamiento lineal de cada compuesto. En las tablas 5.4.1.9 a 5.4.1.13 se presentan los parámetros de regresión lineal, correspondientes.

En el apéndice 2 (figuras A2-11 a A2-15) se presentan los cromatogramas obtenidos de la inyección de las disoluciones utilizadas para las curvas de calibración de método.

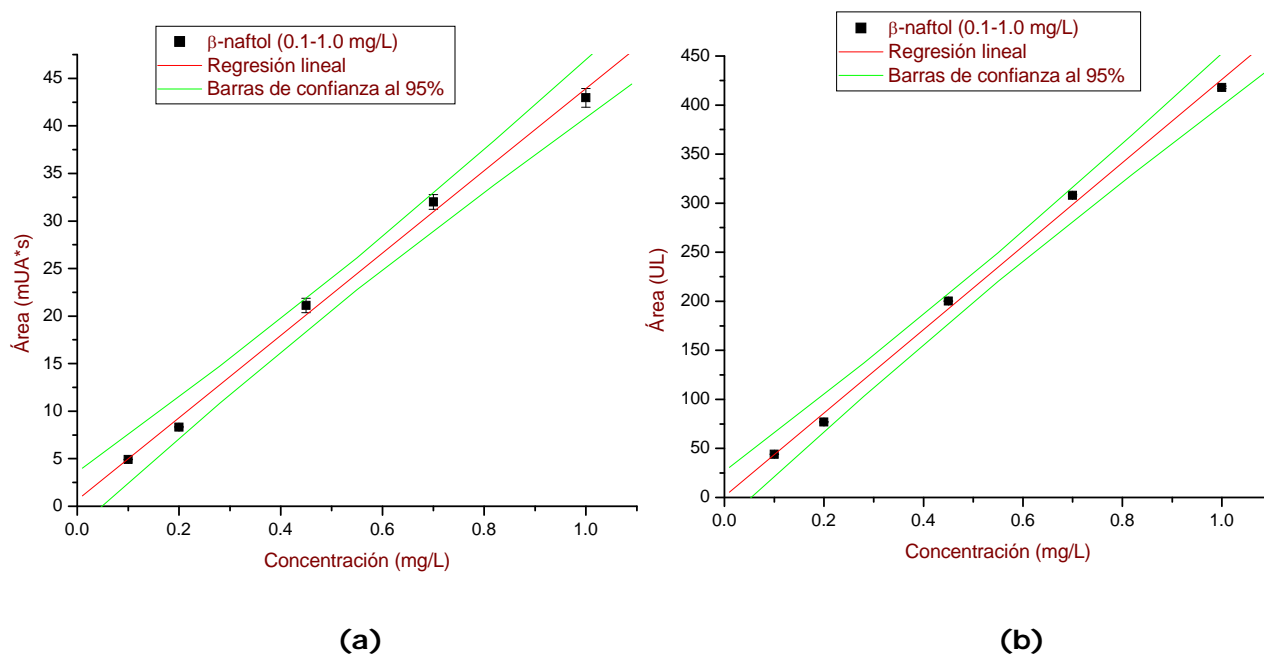
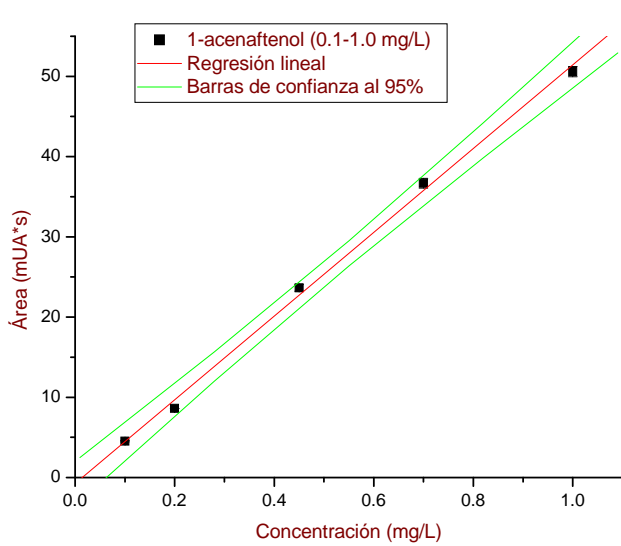


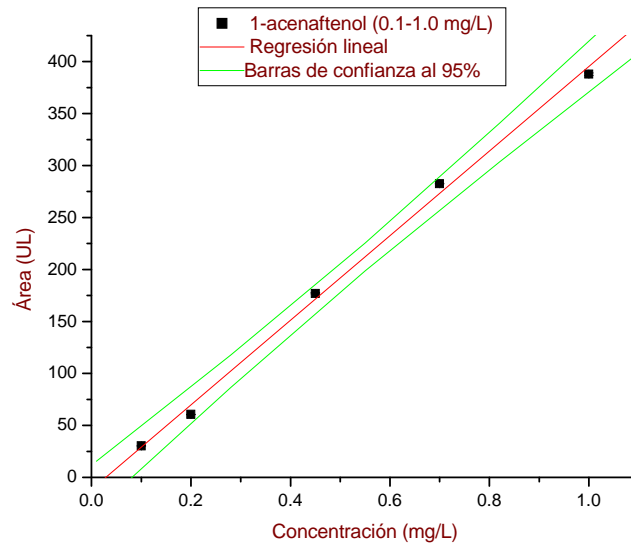
Figura 5.4.1.9. Curvas de calibración de método de β -naftol obtenidas por (a) CLAR-UV y por (b) CLAR-FL en un intervalo de concentración de 0.1-1.0 mg/L.

Tabla 5.4.1.9. Valores de regresión lineal de las curvas de calibración de método de β -naftol por CLAR-UV-FL.

β-naftol (0.1-1.0 mg/L)					
CLAR-UV			CLAR-FL		
<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>r</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>r</i>
43.27	0.67	0.9980	424.95	1.2	0.9985



(a)



(b)

Figura 5.4.1.10. Curvas de calibración de método de 1-acenafteol obtenidas por (a) CLAR-UV y por (b) CLAR-FL en un intervalo de concentración de 0.1-1.0 mg/L.

Tabla 5.4.1.10. Valores de regresión lineal de las curvas de calibración de método de 1-acenafteol por CLAR-UV-FL.

1-acenafteol (0.1-1.0 mg/L)					
CLAR-UV			CLAR-FL		
<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>r</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>r</i>
52.21	-0.77	0.9988	407.23	-11.83	0.9986

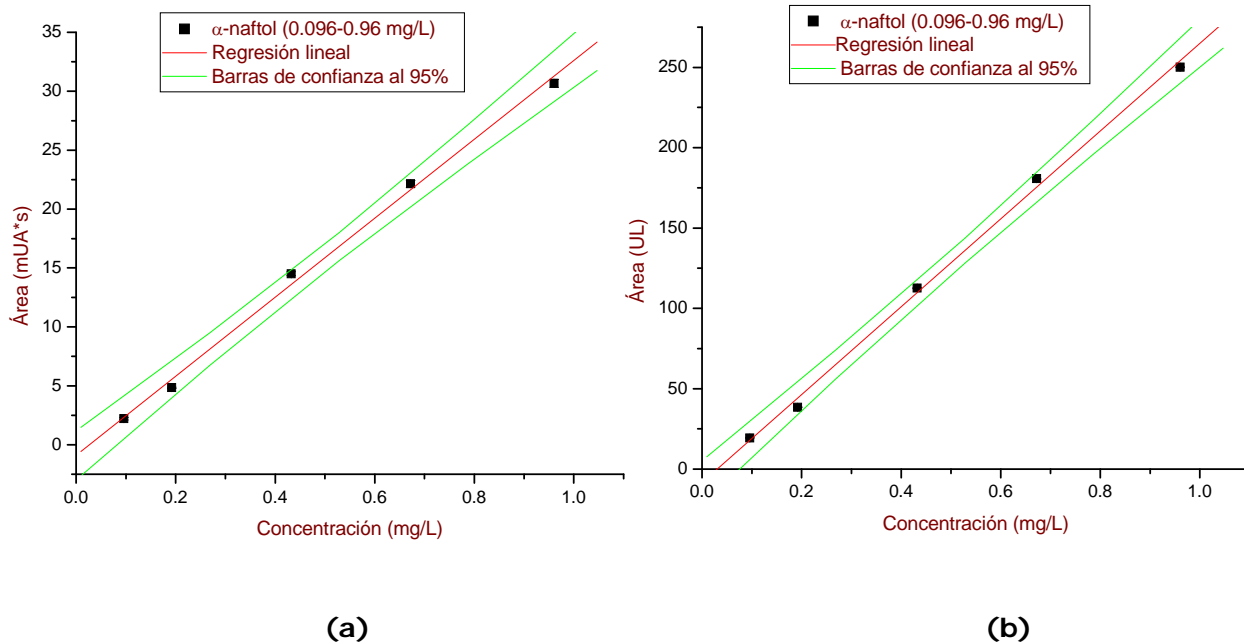
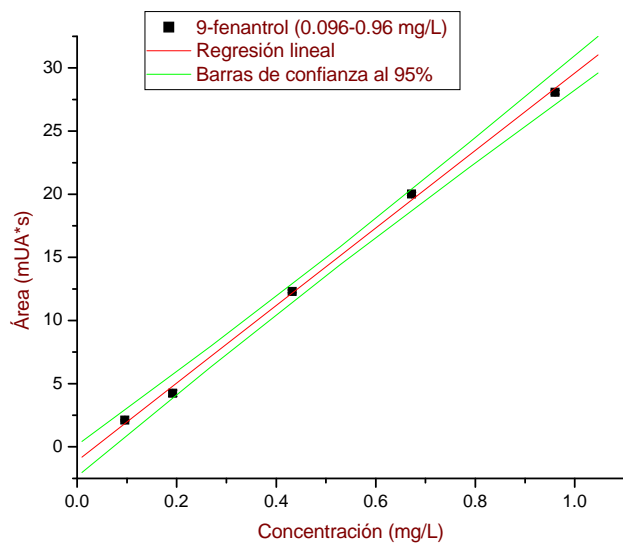


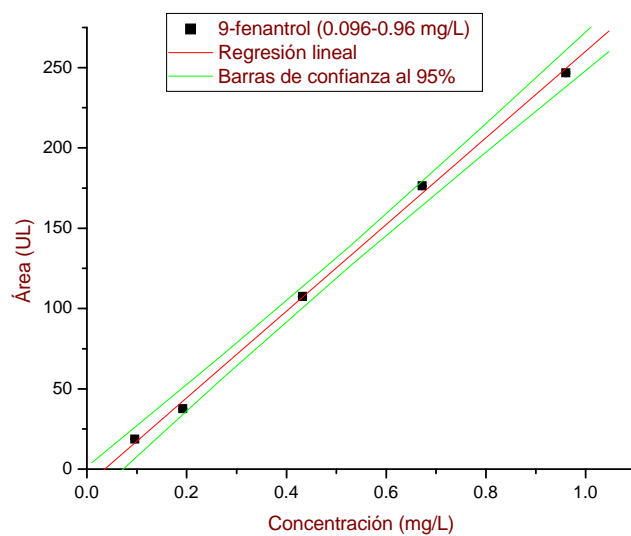
Figura 5.4.1.11. Curvas de calibración de método de α -naftol obtenidas por (a) CLAR-UV y por (b) CLAR-FL en un intervalo de concentración de 0.096-0.96 mg/L.

Tabla 5.4.1.11. Valores de regresión lineal de las curvas de calibración de método de α -naftol por CLAR-UV-FL.

α -naftol (0.096-0.96 mg/L)					
CLAR-UV			CLAR-FL		
<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>r</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>r</i>
33.51	-0.89	0.9982	273.51	-8.42	0.9987



(a)



(b)

Figura 5.4.1.12. Curvas de calibración de método para 9-fenantrol obtenidas por (a) CLAR-UV y por (b) CLAR-FL en un intervalo de concentración de 0.096-0.96 mg/L.

Tabla 5.4.1.12. Valores de regresión lineal de las curvas de calibración de método de 9-fenantrol por CLAR-UV-FL.

9-fenantrol (0.096-0.96 mg/L)					
CLAR-UV			CLAR-FL		
<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>r</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>r</i>
30.72	-1.1	0.9992	269.81	-9.55	0.9992

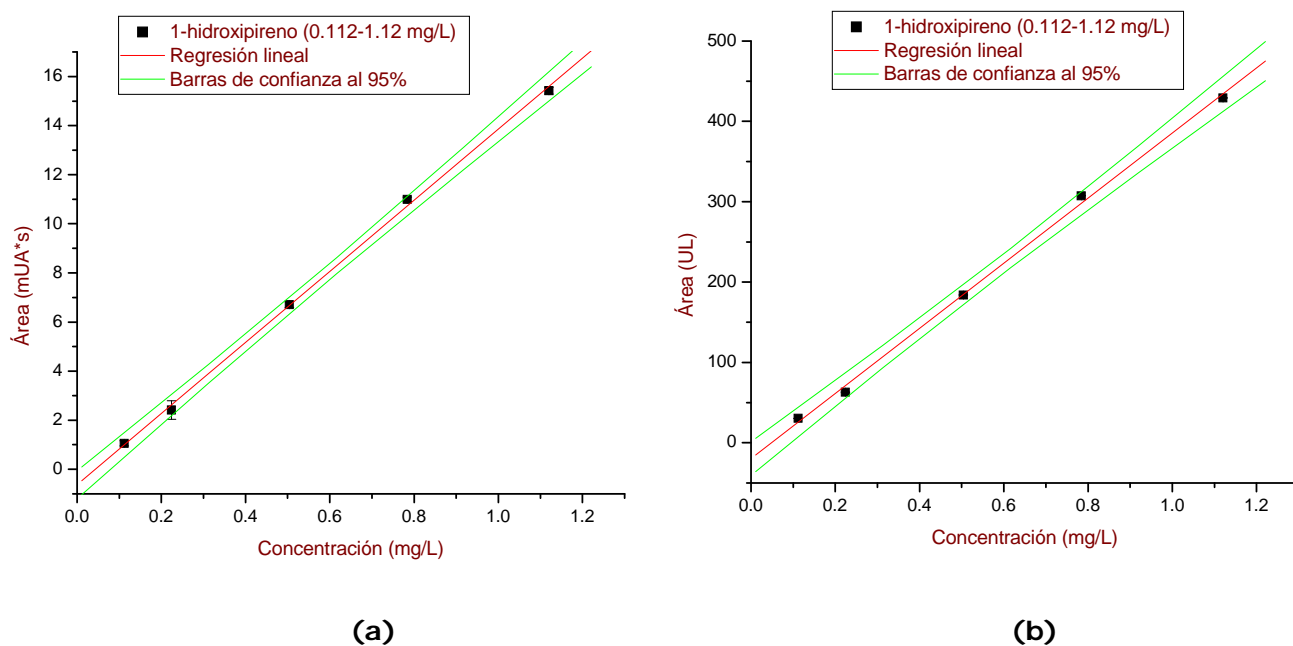


Figura 5.4.1.13. Curvas de calibración de método para 1-hidroxi pireno obtenidas por (a) CLAR-UV y por (b) CLAR-FL en un intervalo de concentración de 0.112-1.12 mg/L.

Tabla 5.4.1.13. Valores de regresión lineal de las curvas de calibración de método de 1-hidroxi pireno por CLAR-UV-FL.

1-hidroxi pireno (0.112-1.12 mg/L)					
CLAR-UV			CLAR-FL		
<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>r</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>r</i>
14.48	-0.63	0.9995	405.29	-19.71	0.9991

De los parámetros de regresión obtenidos se puede concluir que el método es lineal en el intervalo de concentración trabajado, dado que los coeficientes de correlación (r) calculados fueron superiores a 0.99 para todos los compuestos estudiados. Los valores de ordenada al origen son en la mayoría de los casos negativos, excepto para el compuesto β -naftol y los valores de pendiente muestran excelente sensibilidad por fluorescencia.

5.4.2 Especificidad

Los valores de factor de pureza obtenidos por medio del software HP Chemstation for LC revisión A.06.03 (Hewlett Packard 1990-1998) se presentan en la tabla siguiente:

Tabla 5.4.2.1 Factores de pureza de pico de 5 hidroxí-HAPs

<i>Compuesto *</i>	<i>Factor de pureza</i>
β -naftol	998
1-acenaftenol	992
α -naftol	986
9-fenantrol	1000
1-hidroxipireno	987

* Presentados de acuerdo al orden de elución en el cromatograma

Los resultados de factor de pureza o coincidencia indican de acuerdo a la evaluación de resultados explicada en la sección 4.9.2 que para el compuesto 9-fenantrol se obtienen espectros idénticos en los 5 puntos del pico cromatográfico en donde se evaluaron, para los compuestos β -naftol y 1-acenaftenol se tienen espectros similares. En el caso de los compuestos, α -naftol y 1-hidroxipireno el valor de factor de pureza obtenido indica que se tienen alguna similitud entre los espectros, ya que los valores obtenidos se encuentran por debajo de 990 lo que comprueba que estos compuestos contienen alguna impureza espectral.

5.4.3 Precisión

Los valores de precisión instrumental y de método calculados se presentan en las tablas 5.4.3.1 y 5.4.3.2, respectivamente, expresados como porcentaje de coeficiente de variación (%CV). Cabe mencionar que la precisión de un procedimiento analítico se puede considerar en tres niveles, que son: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad (International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Validation of analytical Procedures. QR (R1), (2005). En este caso se llevó a cabo el estudio de repetibilidad.

Tabla 5.4.3.1. Repetibilidad del instrumento (n=10) a concentraciones de hidrox-HAP cercanas al punto medio y 20 % abajo de la mayor concentración de la curva de calibración.

<i>Compuesto</i>	<i>Concentración (mg/L)</i>	<i>CV (%) (DAD)</i>	<i>CV (%) (FLD)</i>	<i>Concentración (mg/L)</i>	<i>CV (%) (DAD)</i>	<i>CV (%) (FLD)</i>
β -naftol	0.051	4.71	3.27	0.086	5.86	1.05
1-acenaftanol	0.053	7.72	11.89	0.085	4.76	15.08
α -naftol	0.053	8.99	2.13	0.085	6.12	1.83
9-fenantrol	0.048	18.34	3.0	0.077	23.13	1.98
1-hidroxipireno	0.047	*	4.08	0.075	*	2.72

* El compuesto 1-hidroxipireno no presentó señal en UV a las concentraciones utilizadas para el estudio de precisión.

Tabla 5.4.3.2. Repetibilidad del método (n=5) a concentraciones de hidrox-HAP 20 % abajo y 20 % arriba del intervalo de concentración de la curva de calibración.

<i>Compuesto</i>	<i>Concentración (mg/L)</i>	<i>CV (%) (DAD)</i>	<i>CV (%) (FLD)</i>	<i>Concentración (mg/L)</i>	<i>CV (%) (DAD)</i>	<i>CV (%) (FLD)</i>
β -naftol	0.28	3.72	0.79	0.82	0.77	0.89
1-acenaftanol	0.28	2.30	0.6	0.82	0.65	0.61
α -naftol	0.27	1.66	0.46	0.79	0.65	0.67
9-fenantrol	0.27	1.10	0.57	0.79	0.43	0.55
1-hidroxipireno	0.31	1.69	0.52	0.92	0.29	0.61

La precisión expresada como porcentaje de coeficiente de variación (%CV), debe de ser de acuerdo al criterio de la EPA, menor que 15%. De acuerdo a este criterio de aceptación en la validación del instrumento se cumple dicha condición para todos los compuestos excepto para el 9-fenantrol, obteniéndose valores de coeficiente de variación de 18.34% y 23.13% por CLAR-UV en las concentraciones estudiadas.

Por otro lado la precisión del método cumple el criterio de aceptación de la EPA en todos los analitos, ya que se obtuvieron valores entre 0.29% CV para el 1-hidroxipireno que fue el más bajo y el más alto fue para el β -naftol con 3.72% CV.

En las figuras A2-16 y A2-17 se presentan los cromatogramas obtenidos de la inyección de las disoluciones utilizadas para el estudio de precisión de método.

5.4.4 Límites de Detección y Cuantificación

Límites de detección y cuantificación instrumentales de HAPs

Tabla 5.4.4.1. Límites de detección y cuantificación instrumentales para cada HAP calculados con los datos obtenidos por CLAR-UV. (área vs concentración)

Compuesto *	LD (mg/L)	LC (mg/L)
Indeno	1.52	2.92
Naftaleno	2.11	3.65
Acenaftileno	1.73	3.31
Bifenilo	1.61	3.4
Acenafteno	1.9	3.5
Fluoreno	1.69	3.43
Fenantreno	1.66	3.15
Antraceno	1.62	3.17
Fluoranteno	1.97	4.17
Pireno	1.62	3.24
Criseno	1.4	3.03
1,2-benzantraceno	1.49	3.12
Benz[e]acefenantrileno	1.53	3.11
Benzo[a]pireno	**	**
Benzo[k]fluoranteno	**	**
1,2:5,6-dibenzantraceno	1.47	3.52

* Presentados de acuerdo al orden de elución en el cromatograma

** No se reportan debido a que los compuestos coeluyen

Tabla 5.4.4.2. Límites de detección y cuantificación instrumentales para cada HAP calculados con los datos obtenidos por CLAR-FL (área vs concentración)

Compuesto *	LD (mg/L)	LC (mg/L)
Indeno	1.27	2.65
Naftaleno	1.2	2.73
Acenaftileno	**	**
Bifenilo	0.99	2.76

Acenafteno	0.84	2.43
Fluoreno	1.06	2.77
Fenantreno	0.95	2.43
Antraceno	1.61	3.07
Fluoranteno	1.12	3.3
Pireno	1.04	2.06
Criseno	1.03	2.64
1,2-benzantraceno	1.12	2.74
Benz[e]acefenantrileno	0.89	2.27
Benzo[a]pireno	***	***
Benzo[k]fluoranteno		
1,2:5,6-dibenzantraceno	1.03	3.07

* Presentados de acuerdo al orden de elución en el cromatograma

** Este compuesto no presenta la propiedad de fluorescencia

*** No se reportan debido a que los compuestos coeluyen

Los límites de detección instrumental obtenidos por CLAR-UV, se encuentran entre 1.4 y 3.07 mg/L y los límites de cuantificación entre 2.92 y 4.99 mg/L, en todos los casos el límite de detección calculado estadísticamente se encuentra por arriba de 1 mg/L sin embargo, en la figura 5.1.1 se presenta el cromatograma correspondiente a una inyección de un estándar de HAPs de concentración aproximada a 1 mg/L. En este cromatograma se puede apreciar que los picos cromatográficos de todos los compuestos son todavía detectables.

Los límites de detección obtenidos por CLAR-FL de 14 HAPs (El compuesto Acenaftileno no presenta la propiedad de fluorescencia) se encuentran entre 0.84 y 1.61 mg/L y los límites de cuantificación entre 2.0 y 3.3 mg/L estos valores son menores que los obtenidos por CLAR-UV, sin embargo se esperaría que fueran mucho menores ya que el detector de fluorescencia es al menos 10 veces más sensible en comparación con el detector de arreglo de diodos.

Los límites de detección y cuantificación mejoran considerablemente cuando se evalúan utilizando los datos de altura en lugar de los datos de área, siendo del orden de $\mu\text{g/L}$ mientras que con los datos de área son del orden de mg/L.

Tabla 5.4.4.3. Límites de detección y cuantificación ¹ instrumentales para cada HAP calculados con los datos obtenidos por CLAR-FL (altura vs concentración)

Compuesto *	LD (µg/L)	LC (µg/L)
Indeno	23	77
Naftaleno	7	22
Acenaftileno	**	**
Bifenilo	10	33
Acenafteno	35	116
Fluoreno	3	11
Fenantreno	5	16
Antraceno	4	13
Fluoranteno	17	58
Pireno	15	51
Criseno	11	36
1,2-benzantraceno	4	12
Benz[e]acefenantrileno	4	13
Benzo[a]pireno	***	***
Benzo[k]fluoranteno		
1,2:5,6-dibenzantraceno	4	14

* Presentados de acuerdo al orden de elución en el cromatograma

** Este compuesto no presenta la propiedad de fluorescencia

*** No se reportan debido a que los compuestos coeluyen

¹ Calculados de acuerdo a lo descrito en el apéndice 4-B

Límites de detección y cuantificación instrumentales de hidroxi-HAPs

Tabla 5.4.4.4. Límites de detección y cuantificación instrumentales para cada hidroxi-HAP, calculados con los datos obtenidos por CLAR-UV. (área vs concentración)

Compuesto	LD (µg/L)	LC (µg/L)
β-naftol	29	56
1-acenaftenol	19	36
α-naftol	20	39
9-fenantrol	23	43
1-hidroxipireno	1188	2454

Tabla 5.4.4.5. Límites de detección y cuantificación instrumentales para cada hidroxi-HAP, calculados con los datos obtenidos por CLAR-FL (área vs concentración)

Compuesto	LD ($\mu\text{g/L}$)	LC ($\mu\text{g/L}$)
β -naftol	18	35
1-acenaftenol	44	88
α -naftol	10	19
9-fenantrol	9	17
1-hidroxipireno	11	22

Tabla 5.4.4.6. Límites de detección y cuantificación instrumentales para cada hidroxi-HAP, calculados con los datos obtenidos por CLAR-FL (altura vs concentración)

Compuesto	LD ($\mu\text{g/L}$)	LC ($\mu\text{g/L}$)
β -naftol	7	24
1-acenaftenol	5	18
α -naftol	9	31
9-fenantrol	14	47
1-hidroxipireno	20	65

Los límites de detección obtenidos por CLAR-UV de los 5 hidroxi-HAPs se encuentran entre 19 $\mu\text{g/L}$ y 1188 $\mu\text{g/L}$. Los límites de cuantificación que se obtienen se encuentran entre 36 $\mu\text{g/L}$ y 2454 $\mu\text{g/L}$.

Los límites de detección obtenidos por CLAR-FL de 5 hidroxi-HAPs se encuentran entre 9 $\mu\text{g/L}$ y 44 $\mu\text{g/L}$. Los límites de cuantificación que se obtienen se encuentran entre 17 $\mu\text{g/L}$ y 88 $\mu\text{g/L}$.

De igual forma que para los HAPs, los límites de detección y cuantificación mejoran considerablemente cuando se evalúan con los datos de altura en lugar de los datos de área. Los límites de detección se encuentran entre 5 $\mu\text{g/L}$ y 20 $\mu\text{g/L}$ y los límites de cuantificación se encuentran entre 18 y 65 $\mu\text{g/L}$.

Límites de detección y cuantificación de método

En la tabla 5.4.4.7 se presentan los límites de detección y cuantificación del método para cada hidrox-HAP, calculados de acuerdo a lo descrito en la sección 4.9.4

Tabla 5.4.4.7. Límites de detección y cuantificación de método para cada hidrox-HAP, obtenidos por CLAR-UV-FL

Compuesto	UV		FL	
	LDM ($\mu\text{g/L}$)	LCM ($\mu\text{g/L}$)	LDM ($\mu\text{g/L}$)	LCM ($\mu\text{g/L}$)
β -naftol	9	30	4	12
1-acenaftanol	5	17	3	9
α -naftol	8	28	3	11
9-fenantrol	9	30	3	9
1-hidroxipireno	22	72	4	15

La sensibilidad en la detección por fluorescencia, así como la selectividad del adsorbente de extracción utilizado permiten una detección de hidrox-HAPs entre 3 y 4 $\mu\text{g/L}$ en un volumen de muestra de 10 mL. Estos valores son comparables con lo reportado en la literatura (tabla 3.11.2.2) en donde obtienen límites de detección del orden de ppb´s utilizando la misma técnica de detección y de ppt´s utilizando técnicas como GC/HRMS y LC/MS/MS, cabe mencionar que en la mayoría de los métodos de determinación de metabolitos de HAPs se lleva a cabo una reacción de hidrólisis enzimática, previa a la extracción, lo cual permite liberar los metabolitos presentes en el organismo de personas altamente expuestas a HAPs. En este caso no se llevo a cabo este tratamiento por tratarse de muestras de orina de personas no expuestas adicionadas con los metabolitos.

Cabe mencionar que debido a que la composición de las mezclas de HAPs en los diferentes ambientes laborales es variable, aún no se han establecido valores límites de exposición.

En la figura A2-18 se presenta uno de los cromatogramas obtenidos de la inyección de la disolución de hidrox-HAPs de 0.1 mg/L utilizada para el estudio de límite de detección de método.

5.5 Evaluación de interferencias de HAPs en la determinación de hidroxi-HAPs.

Al inyectar la mezcla de HAPs e hidroxi-HAPs bajo las condiciones óptimas de separación de hidroxi-HAPs se obtuvieron los cromatogramas de la figura 5.5.1, en donde puede observarse que se logra la separación de los metabolitos del resto de los HAPs, obteniéndose valores de resolución mayores a 1.5, excepto para el pico que eluye en 7.7 minutos que corresponde al compuesto 1-hidroxipireno, la resolución con respecto al pico más próximo es de 1.1, sin embargo el compuesto de interés presenta una señal en fluorescencia que lo puede distinguir del resto de los HAPs. Como es de esperarse, la mayoría de los HAPs coeluyen en un tiempo entre 10 y 14 minutos, en donde la cantidad de disolvente orgánico se encuentra en 100%.

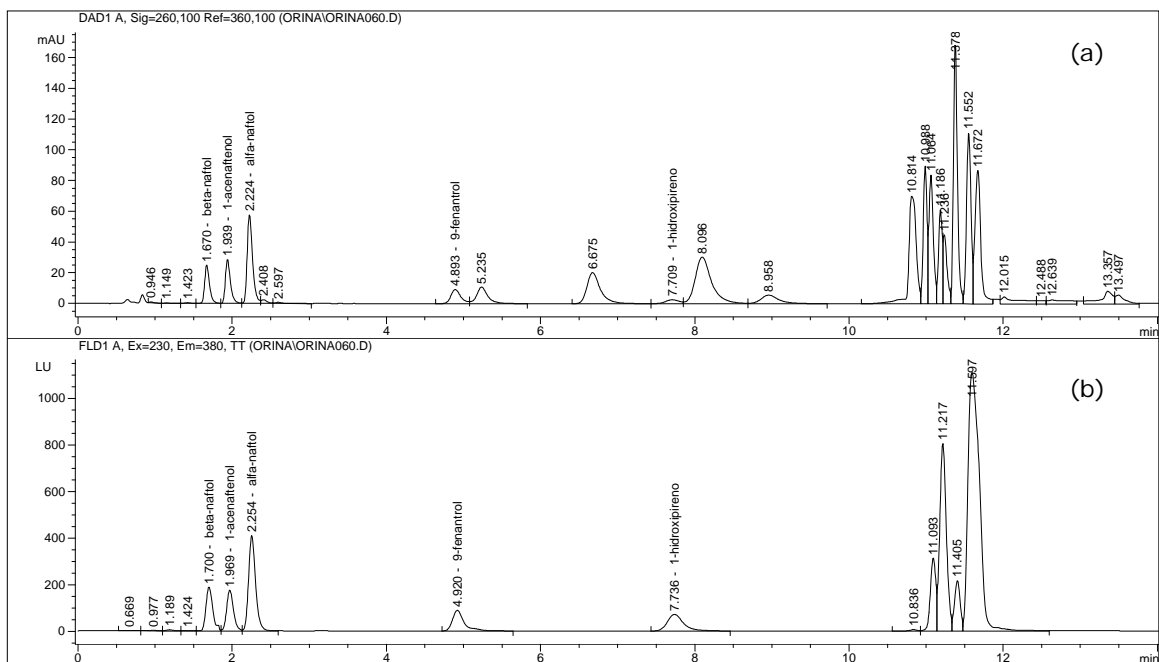


Figura 5.5.1. Cromatogramas obtenidos de la inyección de una mezcla de HAPs e hidroxi-HAPs por CLAR-UV (a) y CLAR-FL (b). Inyectada en las condiciones óptimas de separación de hidroxi-HAPs (*sección 4.6*). Concentración aproximada 20 mg/L.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

Con lo realizado en este trabajo de tesis se ha podido implementar un método de análisis que permite determinar α -naftol, β -naftol, 1-acenaftenol, 9-fenantrol y 1-hidroxipireno, en muy bajos niveles de concentración y con un buen nivel de precisión en muestras de orina. El método se basa en la aplicación de la extracción en fase sólida para la limpieza, extracción y concentración de los analitos de interés en muestras de orina, seguido del análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución con detectores de arreglo de diodos y fluorescencia.

Una de las ventajas de este método es la determinación específica de los metabolitos sin la interferencia de los compuestos progenitores en un tiempo de análisis muy corto. Lo anterior se hace posible debido a la selección de longitudes de onda de emisión y excitación específicas de cada compuesto.

Se propone que este método se aplique al análisis de muestras de orina de los habitantes de la población de San Nicolás, Tequisquiapan, Qro., en la cual la mayor parte de los habitantes se dedica a la fabricación de ladrillo por lo que la exposición a HAPs es crónica, por ello es necesario considerar que las muestras a analizar contengan además de los metabolitos, mezclas complejas de HAPs por lo que como parte del trabajo realizado se lograron establecer las condiciones óptimas de separación por CLAR-UV-FL para el análisis de 16 HAPs entre los que se encuentran 14 incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la EPA.

Una vez optimizada la separación se realizó la validación instrumental obteniéndose resultados satisfactorios de precisión y linealidad dentro de los criterios de aceptación establecidos por la EPA, así mismo se determinaron los límites de detección y cuantificación para cada HAP obteniéndose valores del orden de ppm por UV y de ppb por fluorescencia.

Cabe señalar que este trabajo es parte inicial de un estudio de evaluación de riesgo, y que también habrá que evaluar el impacto al ambiente y a la salud que estos compuestos representan.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P. Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry: application to mussels. *Journal Analytical Chemistry* (1997), *359*, 502-509.
2. Bouzige, M., Pichon, V., Hennion, M.C. On-line coupling of immunosorbent and liquid chromatographic analysis for the selective extraction and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples at the ng l⁻¹ level. *Journal of Chromatography A* (1998), *823* 197-210.
3. Budavari, S., y cols. "The Merck Index" 30 edición, Merck & Co., INC. Estados Unidos (2001).
4. CENICA. Informe de la situación y los conocimientos actuales sobre las principales Fuentes y emisiones de dioxinas en México. Centro de Investigación y Capacitación Ambiental. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México, segundo reporte, revisión 1, (2002).
5. DEGASA. Primer diagnóstico nacional de salud ambiental y ocupacional. Dirección general de salud ambiental, Secretaria de Salud, México, (2002).
6. Denissenko, M., Pao, A., Tang, M. Preferential formation of benzo(a)pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science*, (1996), *274*, 430-432.
7. Díaz, N., Garza, H., Castro, R., Ramírez, E., Barbarín, J., Salazar, M., Waksman, N. A comparison of the performance of two chromatographic and three extraction techniques for the analysis of PAHs in sources of drinking water. *Journal of Chromatographic Science* (2007), *45*.
8. Ellenhorn, M. J. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. En: *Ellenhorn's Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*. Second edition. Baltimore: Williams & Williams, (1997), 1420-1447.
9. Elovaara, E., Väänänen, V., Mikkola, J. Simultaneous analysis of naphthols, phenanthrols, and 1-hydroxypyrene in urine as biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure: intraindividual variance in the urinary metabolite excretion profiles caused by intervention with β -naphthoflavone induction in the rat. *Archives of Toxicology*, (2003), *77*, 183-193.
10. Filipkowska, A.; Lubecki, L.; Kowalewska, G. "Polycyclic aromatic hydrocarbon analysis in different matrices of the marine environment". *Analytica Chimica Acta*, (2005), *547*, 243-254.

11. Frank, S., Renner, T., Ruppert, T. Determination of albumin adducts of (+)-anti-benzo(a)pyrene-diol-epoxide using an high performance liquid chromatographic column switching technique for sample preparation and gas chromatography-mass spectrometry for the final detection. *Journal of Chromatography B*, (1998), *713*, 313-317.
12. Greim H, Csanády G, Filser J.G., Kreuzer P., Schwarz L., Wolf T., Werner S. Biomarkers as tools in human health risk assessment. *Clin Chem* (1995), *41* (12): 1804-1808.
13. Grimmer, G., Jacob, J., Dettbarn, G., Naujack, K.W. Determination of urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) for the risk assessment of PAH-exposed workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, (1997), *69*, 231-239.
14. Hodgeson, J.W., Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water by Liquid-Liquid Extraction and HPLC with coupled ultraviolet and fluorescence detection, Method 550 USEPA, (1990).
15. Huang, W., Grainger, J., Patterson, D.G., Turner, W.E., Caudill, S.P. Needham, L.L., Pirkle, J.L., Sampson, E.J. Comparison of 1-hydroxypyrene exposure in the US population with that in occupational exposure studies. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, (2004), *77*, 491-498.
16. International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Validation of analytical Procedures. QR (R1). (2005).
17. Jacob, P., Wilson, M., Benowitz, N. Determination of phenolic metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine as their pentafluorobenzyl ether derivatives using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* (2007), *79* (2), 587-598.
18. Jongeneelen, F.J., Bos, R.P., Anzion, R.B.M., Biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons. Metabolites in urine. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, (1986) *12* (12), 137-143.
19. Jongeneelen, F.J., Anzion, R.B.M., Scheepers, P.T.J., Bos, R.P., Henderson Th., Nijenhuis, E.H., Veenstra, S.J., Winkes, A. 1-hydroxypyrene in urine as a biological indicator of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in several work environments. *Annals of Occupational Hygiene*, (1988), *31* (1), 35-43
20. Jongeneelen, F.J. Methods for routine biological monitoring of carcinogenic PAH-mixtures. *The Science of the Total Environment*, (1997), *199*, 141-149.

21. Jongeneelen, F.J., Anzion, R.B.M., Henderson. Determination of Hydroxylated Metabolites of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Urine. *Journal of Chromatography*, (1987), *413*, 227-232.
22. Kaserouni, N., Sinha, R., Hsu, C., Greemberg, Rothman, N. Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food Chem Toxicol*, (2001), *39* (5): 423-436.
23. Karakaya, A., Ates, I., Yucesoy, B., Effects of occupational polycyclic aromatic hydrocarbon exposure on T-lymphocyte functions and natural killer cell activity in asphalt and coke oven workers. *Human & Experimental Toxicology*, (2004), *23*, 317-322.
24. Kousmanen, K., Hyötyläinen, T., Hartonen, K., Riekkola, M. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and sediment with on-line coupled pressurized hot water extraction, hollow fibre microporous membrane liquid-liquid extraction and gas chromatography. *Analyst* (2003) *128*, 434-439.
25. Krewski, D., Thorslund, T., Withey, J. Carcinogenic risk assessment of complex mixtures. *Toxicology and Industrial Health* (1989), *5*: 851-867.
26. Kuusimäki, L., Peltonen, Y.; Mutanen, P., Peltonen, K, Savela, K. Urinary hydroxyl-metabolites of naphthalene, phenanthrene and pyrene as markers of exposure to diesel exhaust. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. (2004), *77*, 23-40.
27. Li, Z., Romanoff, L.C., Trinidad, D.A., Hussain, N., Jones, R.S., Porter, E.N., Patterson, D.G., Sjödin, A., Measurement of urinary monohydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons using automated liquid-liquid extraction and gas chromatography/isotope dilution high-resolution mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, (2006), *78*, 5744-5751.
28. Maissonette, C., Simon, P., Hennion, MC., Pichon, V. Selective immunoclean – up followed by liquid chromatography for the monitoring of a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in urine at the ng l⁻¹ level. *Journal of Chromatography A* (2006), *1120* (1-2), 185-193.
29. Mastrandea. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* (2005).
30. Método MTA/MB-023/A99 “Determinación de 1-hidroxipireno en orina-Método de hidrólisis enzimática con detección fluorimétrica/Cromatografía líquida de alta resolución”. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT), Baracaldo, Vizcaya. (1995).
31. Miller, J.C., Miller, J.N. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, Prentice Hall, España (2002).

32. Nieva-Cano, M.J., Barroso, S.R., Santos-Delgado, M.J. Determination of PAH in food samples by HPLC with fluorimetric detection following sonication extraction without sample clean-up. *Analyst* (2001) *126*; 1326-1331.
33. Pensado, L., Casais, M.C., Mejuto, M.C., Cela, R. Application of matrix solid – phase dispersión in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. *Journal of Chromatography A* (2005) *1077*; 103-109.
34. Romanoff, L., Li, Z., Young, K., Blakely, N., Patterson, D., Sandau, C. Automated solid-phase extraction method for measuring urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in human biomonitoring using isotope-dilution gas chromatography high-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* (2006), *835*, 47-54.
35. Schedl, M., Wilharm, G., Achatz, S., Kettrup, A., Niessner, R., Knopp, D. Monitoring Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites in Human Urine: Extraction and Purification with a Sol-Gel Glass Immunosorbent. *Analytical Chemistry* (2001) *73*, 5669-5676.
36. Sigma-Aldrich Co. Guide to Solid Phase Extraction, Bulletin 910 (1998).
37. Shimada, T., Hayes, C., Yamazaki, H. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P450-1B1. *Cancer Res* (1996), *56*, 2979-84.
38. Spivack S, Hurteau G, Reilly A, Aldours K. CYP1B1 expression in human lung. *Drug Metab Dispos* (2001), *29*, 916-922.
39. Stellman JM, McCan M. Hidrocarburos poliaromáticos. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. 3ª edición. Madrid: Organización Internacional del Trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales - Subdirección General de Publicaciones, (2001).
40. Tolos, W.P., Shaw, P.B., Lowry, L.K., Mackenzie, B.A., Deng, J.F., Markel, H.L. 1-Pyrenol: A Biomarker for Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Applied Occupational Environmental Hygiene*, (1990), *5*, 303-309.
41. Van Rooij, J.G.M., Van Leishout, E.M.A., Bodelier-Bade, M.M., Jongeneelen, F.J., Effect of the reduction of skin contamination on the internal dose of creosote workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Scandinavian Journal of work, Environmental and Health*, (1993), *19* (3), 200-207.
42. Vera-Ávila L.E., Cázares-Ibañez E.A., Covarrubias-Herrera R., Camacho-Frías E. Metodología en línea para la determinación de hidrocarburos aromáticos polinucleares en agua al nivel de ultratrazas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, (2002), *18* (1) 5-16.

43. Wegener, J.W.M., Hopman-Ubbels, G.H.J., Van Velzen, M. Improve glucuronide hydrolysis in the determination of urinary 1-hydroxypyrene. *Journal of Chromatography A* (2006), *1134*, 232-235.
44. Wingrove, A.S., Caret, R.L., *Organic Chemistry*, Harper & Row, (1981), 551-553.
45. Wu, J.; Wong, M.K.; Lee, H.K.; Shi, C.Y.; Ong, "Determination of Polycyclic aromatic hydrocarbons in rougan, a traditional Chinese barbecued food, by capillary gas chromatography". *Environmental Monitoring and Assessment* (1997), *44*, 577-585.
46. Xu, X., Zhang, J., Zhang, L., Liu, W., Weisel, C.P. Selective detection of monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine using liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *18*; 2299-2308; (2004).
47. Yeakub Ali, M.; Richard, B. Cole. "One-step SFE-plus-C₁₈ selective extraction of low polarity compounds, with lipid removal, from smoked fish and bovine milk". *Anal Bioanal Chem*, (2002), *374*, 923-931.
48. Zheng, L., Romanoff, L.C., Trinidad, D.A., Hussain, N., Jones, R.S., Porter, E.N., Patterson, D., Sjödin, A. Measurement of urinary monohydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons using automated liquid-liquid extraction and gas chromatography/isotope dilution high resolution mass spectrometry. *Analytical Chemistry* (2006), *78* (16), 5744-5751.
49. Zuazagoitia, D., Millán, E., Garcia, R. A screening method for polycyclic aromatic hydrocarbons determination in water by headspace SPME with GC-FID. *Chromatographia* (2007), *66*, 773-777.
50. <http://monographs.iarc.fr>. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, IARC International Agency for Research on Cancer, Monographs, Vol 63, Lyon, (1995).
51. www.mtas.es. Fichas Internacionales de Seguridad, Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene, Madrid.
52. www.who.int/ipcs/en. World Health Organization. International Programme on Chemical Safety (IPCS): Environmental Criteria 202. Selected non-heterocyclic PAHs. Geneva; (1998).
53. www.atsdr.cdc.gov. Agency for Toxic Substances & Disease Registry. Priority List of Hazardous Substances (2007).
54. www.accustandard.com/asi/epa. EPA Methods (2002-2008).

APÉNDICE 1

Espectros UV
de
HAPs e Hidroxi-HAPs

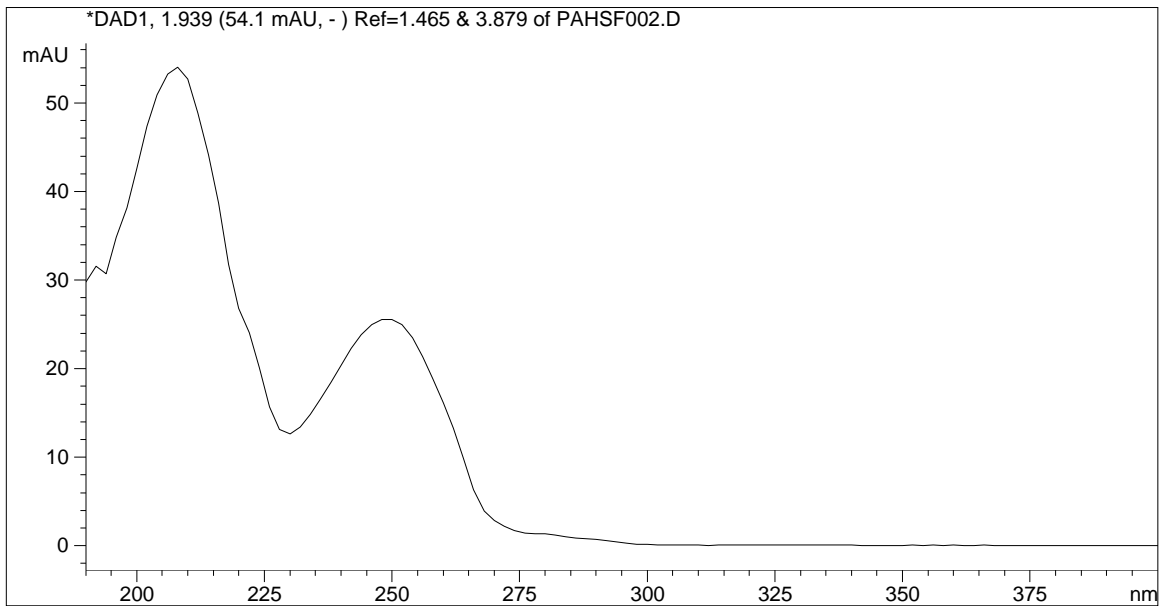


Figura A1-1. Espectro de UV del indeno. Concentración 10 mg/L

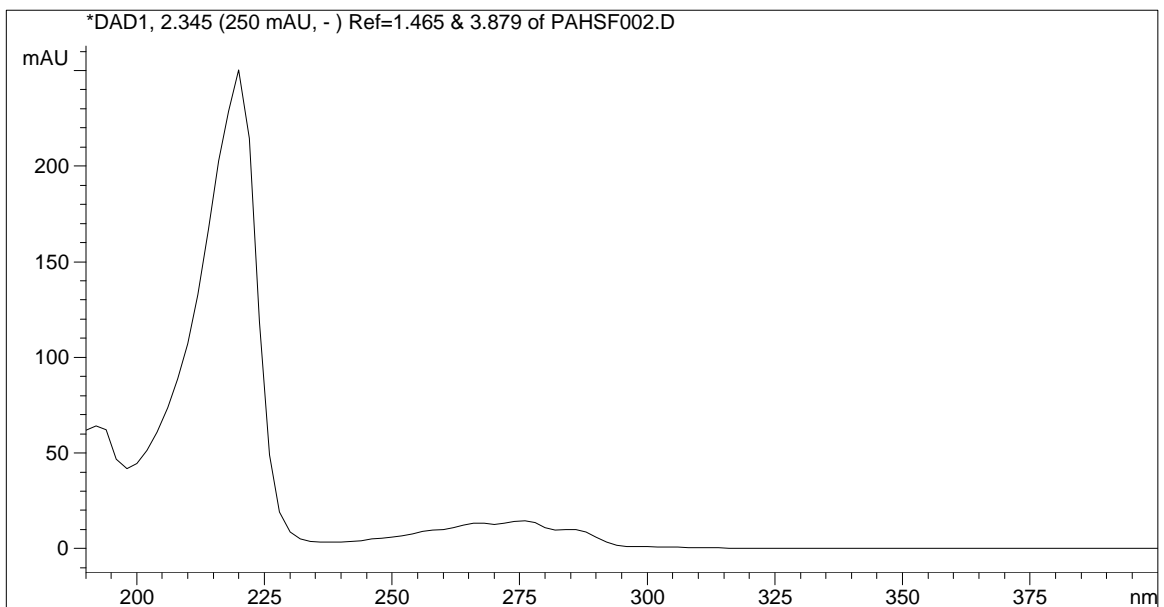


Figura A1-2. Espectro de UV del naftaleno. Concentración 10.8 mg/L

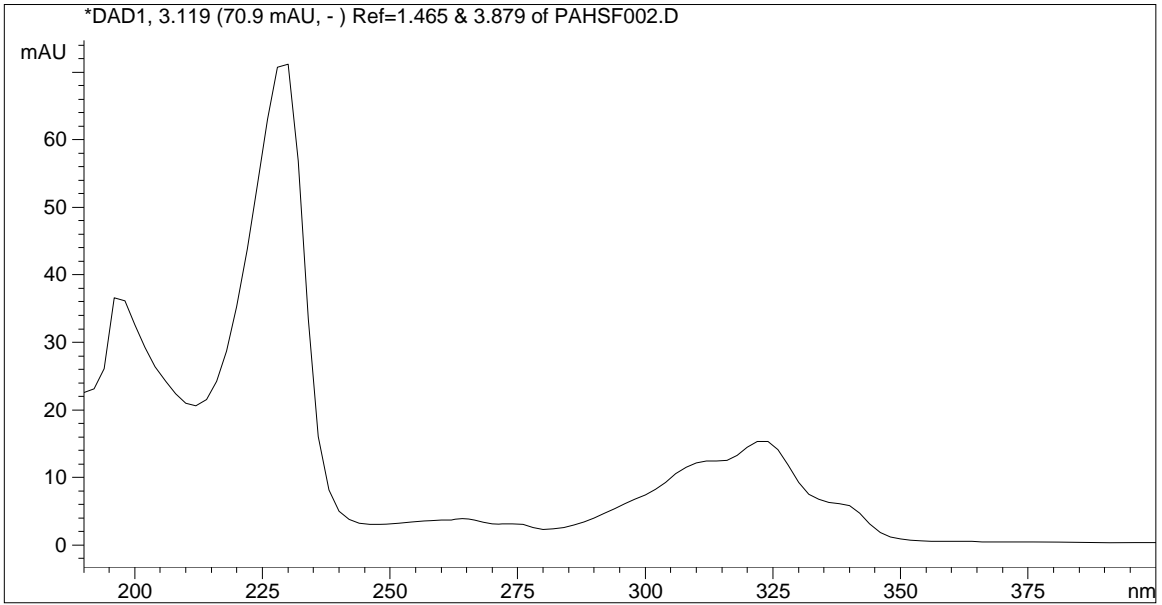


Figura A1-3. Espectro de UV del acenaftileno. Concentración 10.4 mg/L

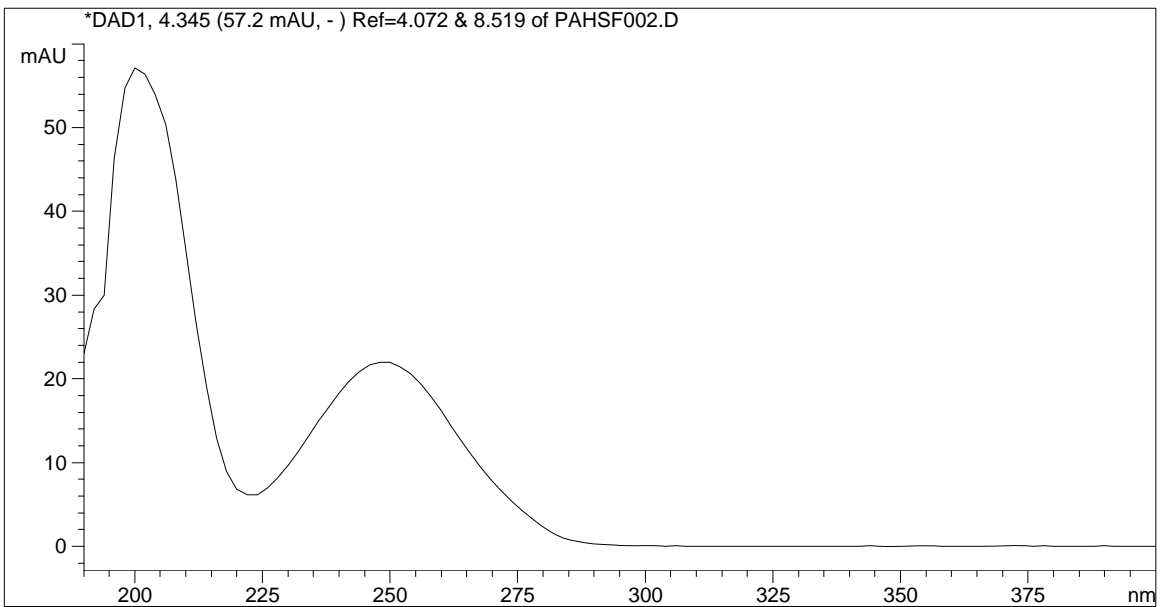


Figura A1-4. Espectro de UV del bifenilo. Concentración 9.6 mg/L

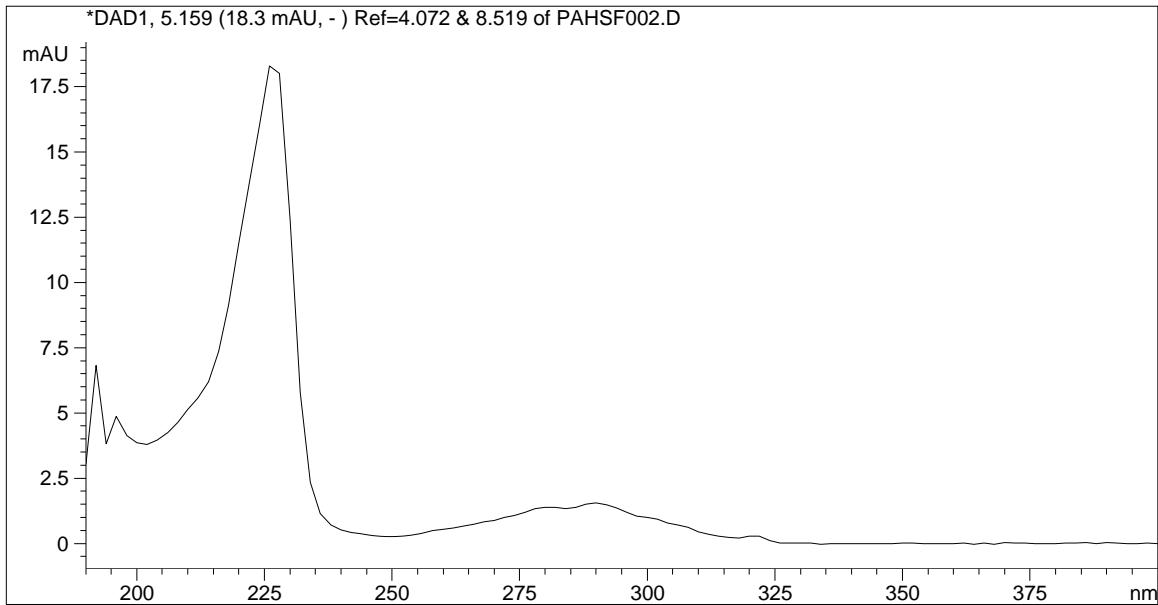


Figura A1-5. Espectro de UV del acenafteño. Concentración 10 mg/L

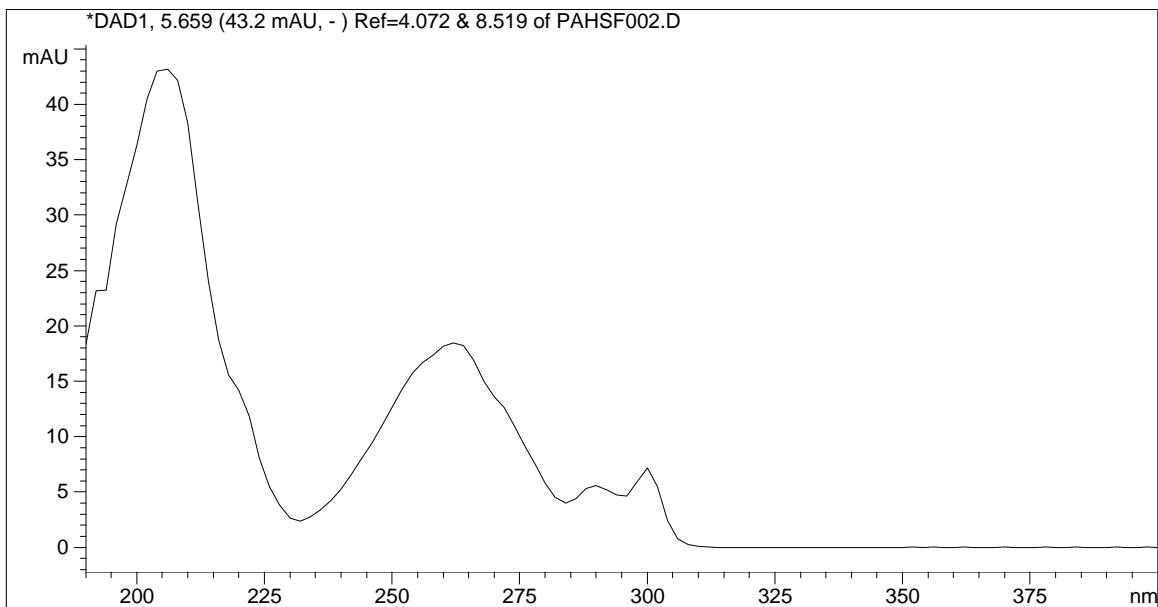


Figura A1-6. Espectro de UV del fluoreno. Concentración 10 mg/L

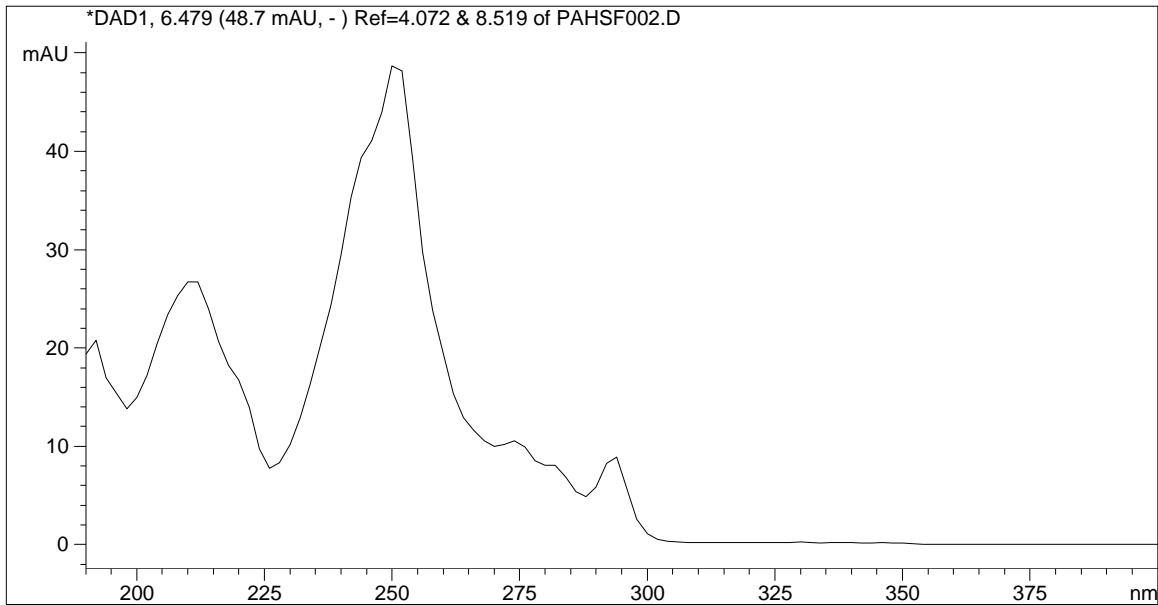


Figura A1-7. Espectro de UV del fenantreno. Concentración 9.6 mg/L

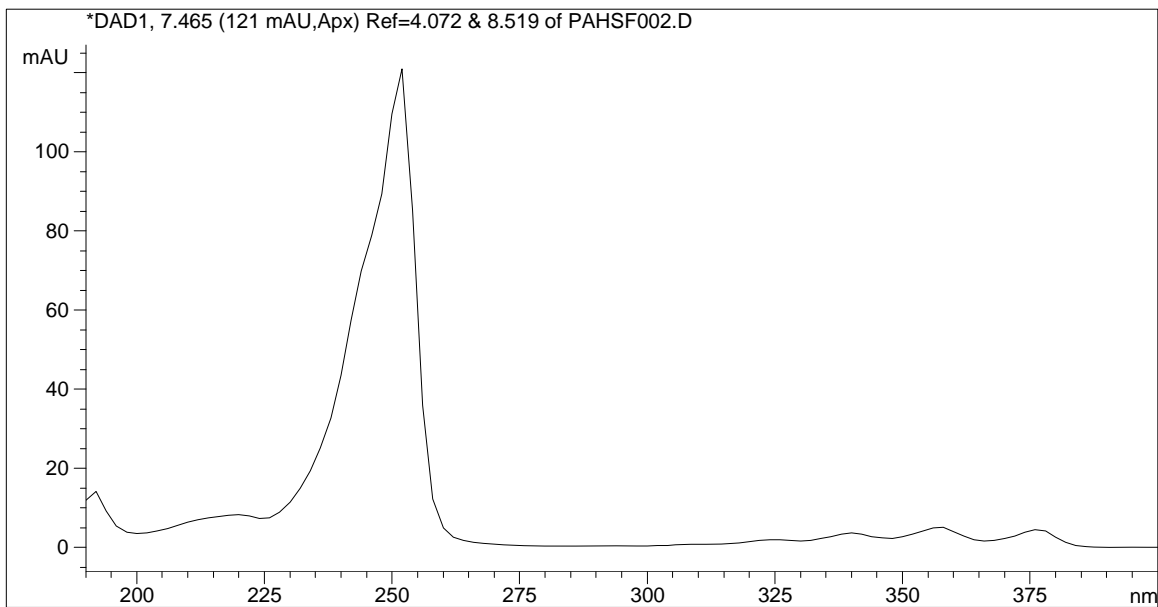


Figura A1-8. Espectro de UV del antraceno. Concentración 11.6 mg/L

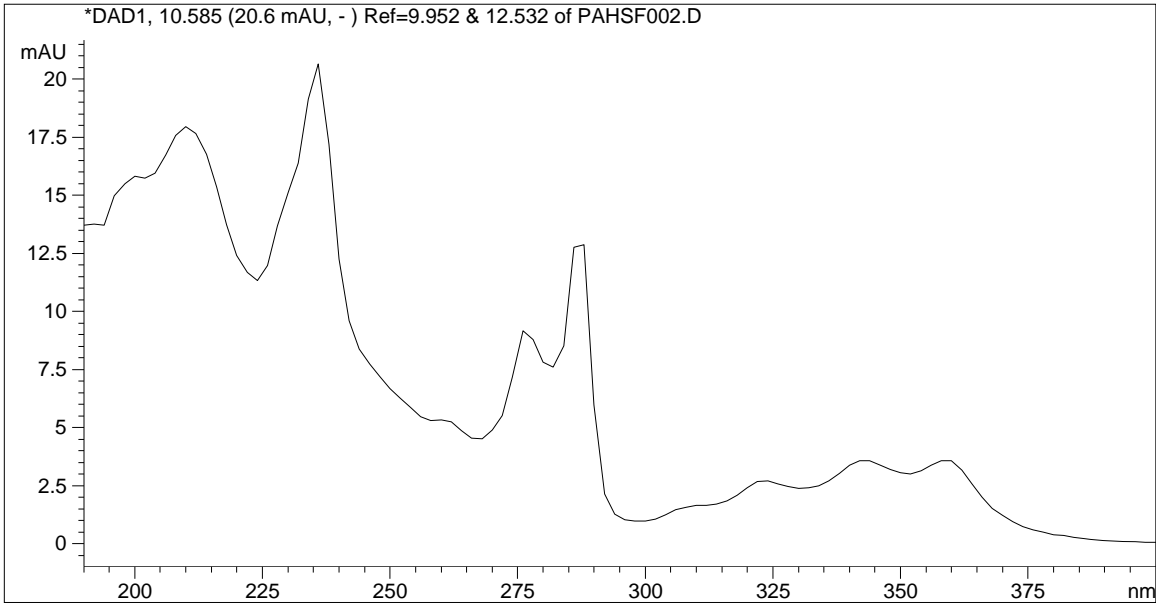


Figura A1-9. Espectro de UV del fluoranteno. Concentración 10 mg/L

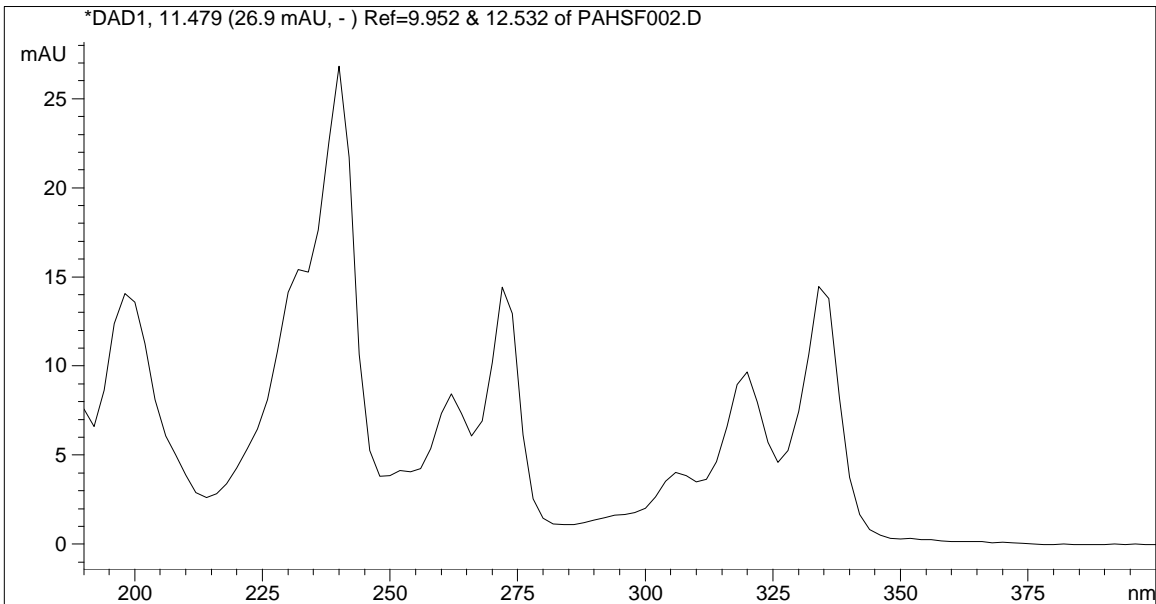


Figura A1-10. Espectro de UV del pireno. Concentración 8.8 mg/L

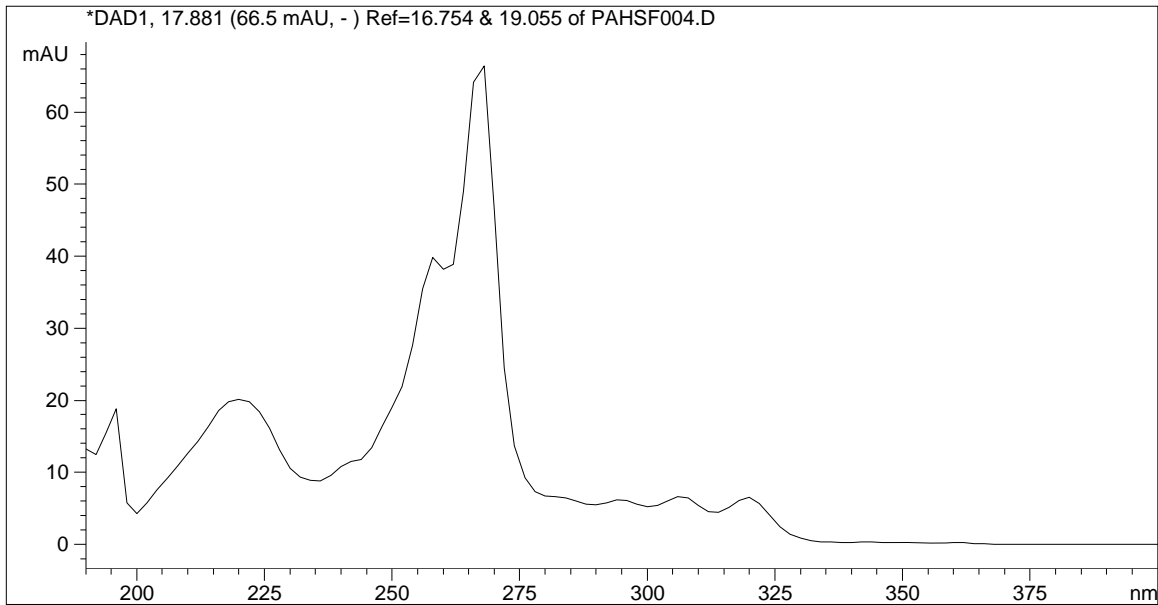


Figura A1-11. Espectro de UV del criseno. Concentración 9.2 mg/L

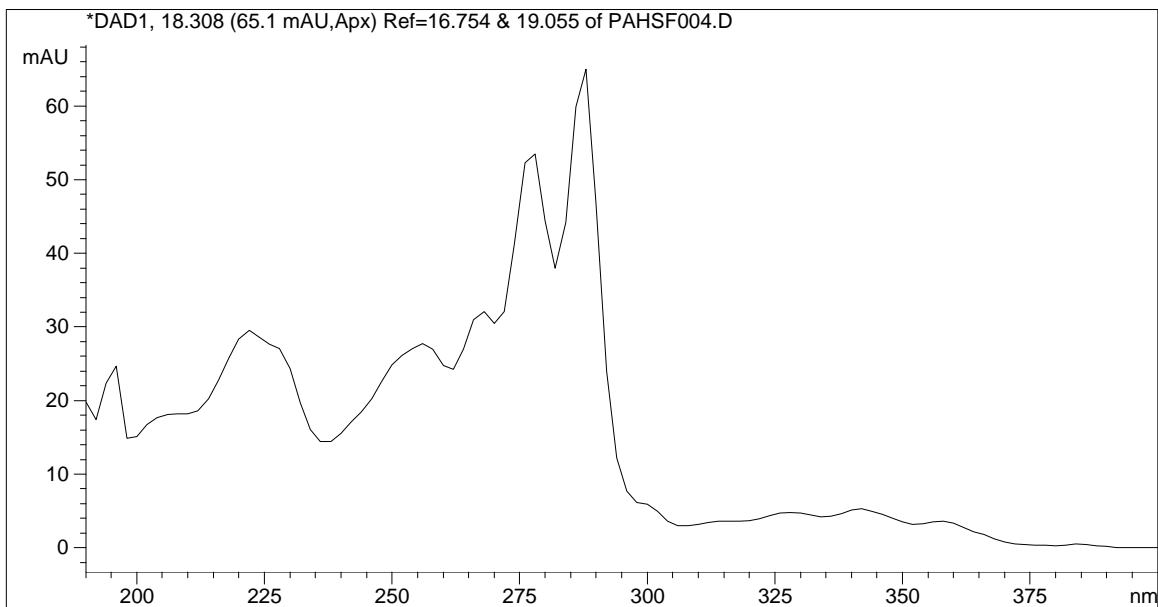


Figura A1-12. Espectro de UV del 1,2-benzantraceno. Concentración 10.4 mg/L

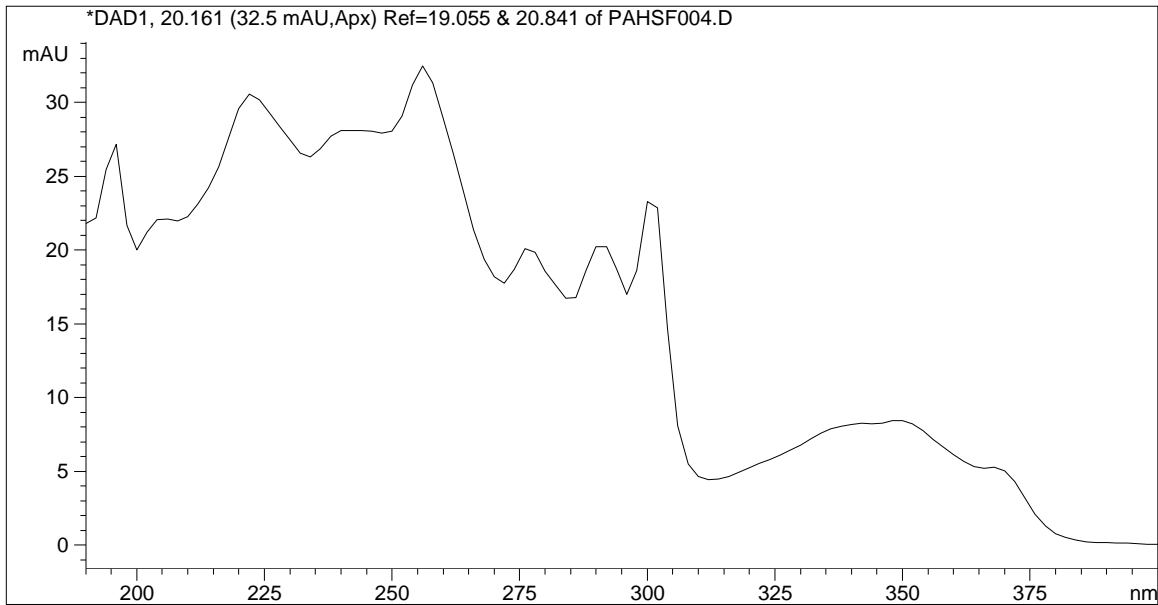


Figura A1-13. Espectro de UV del benz[e]acefenantrileno. Concentración 8 mg/L

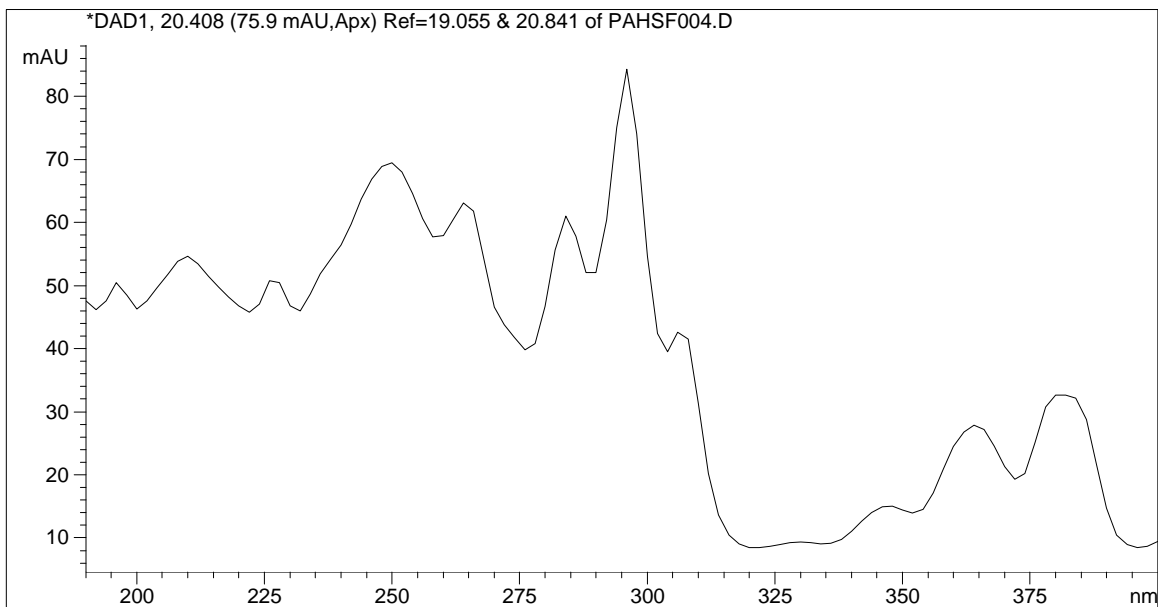


Figura A1-14. Espectro de UV del benzo[k]fluoranteno. Concentración 8 mg/L

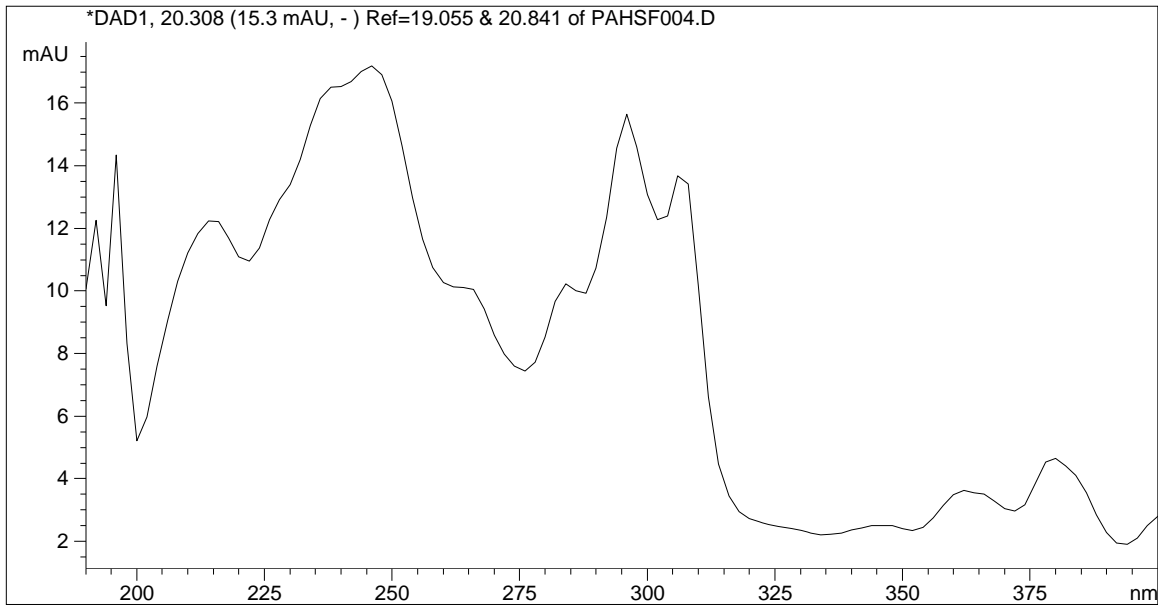


Figura A1-15. Espectro de UV del benzo[a]pireno. Concentración 9.6 mg/L

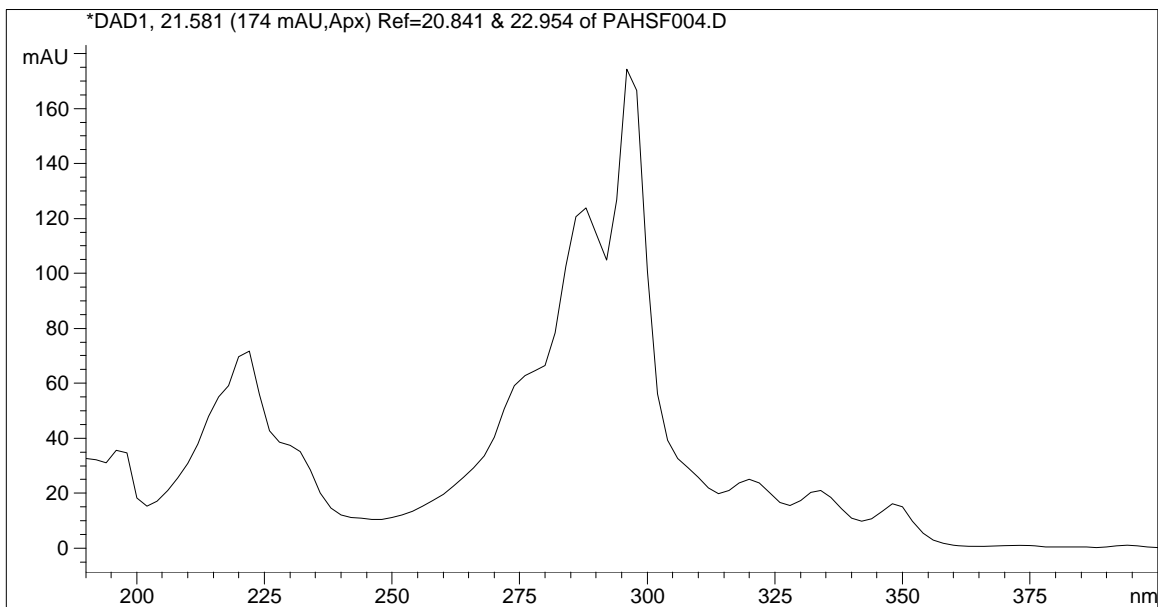


Figura A1-16. Espectro de UV del 1,2:5,6-dibenzantraceno. Concentración 9.6 mg/L

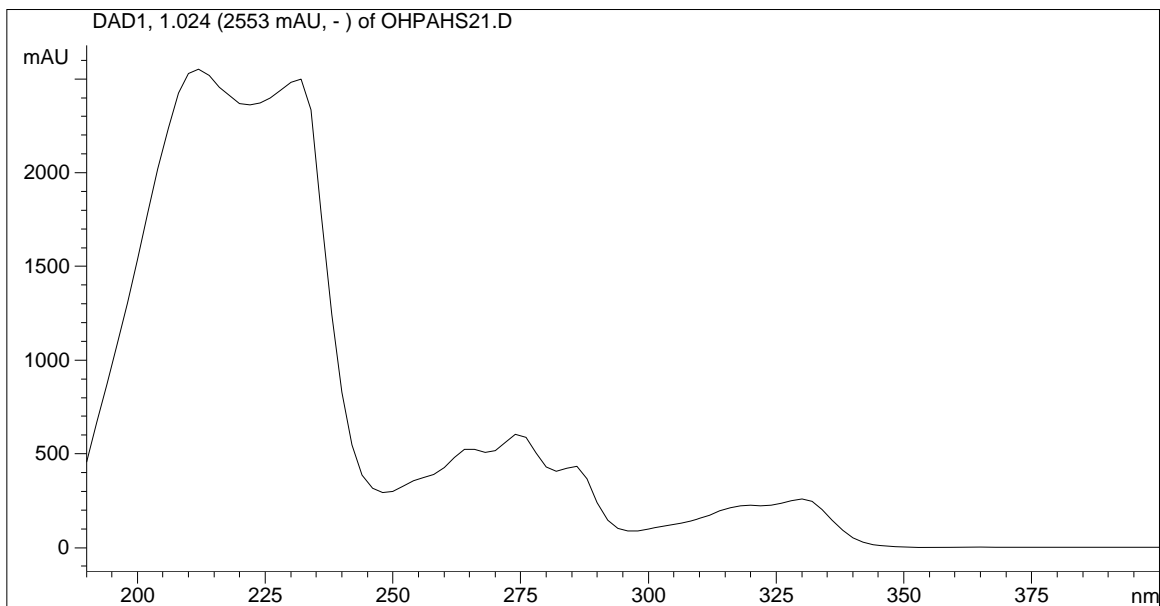


Figura A1-17. Espectro de UV del beta-naftol. Concentración 96 mg/L

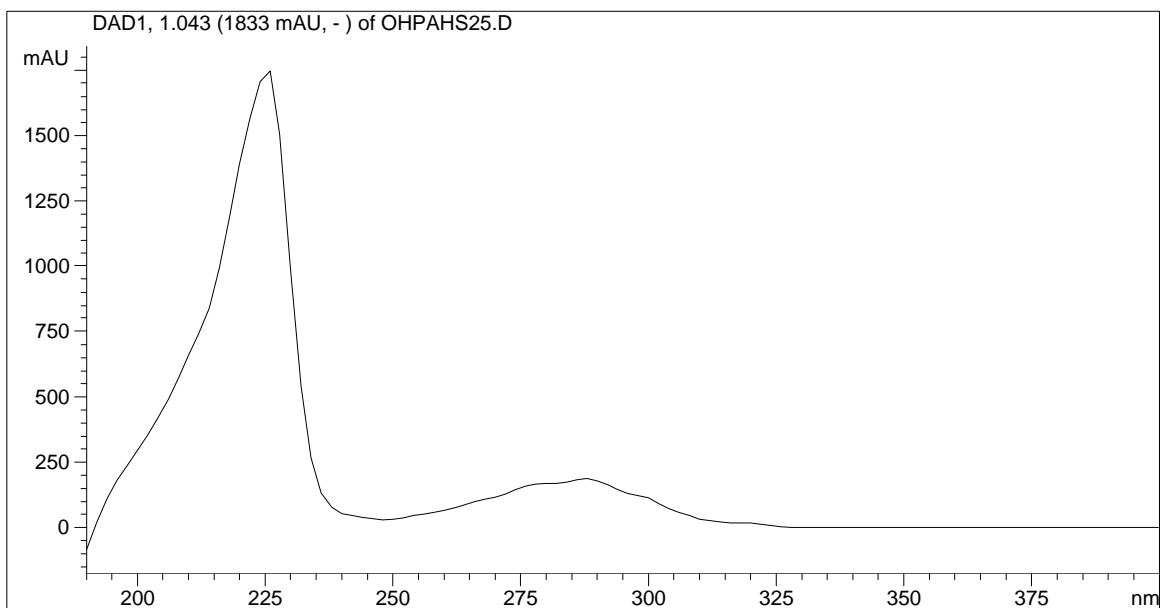


Figura A1-18. Espectro de UV del 1-acenaftanol. Concentración 100 mg/L

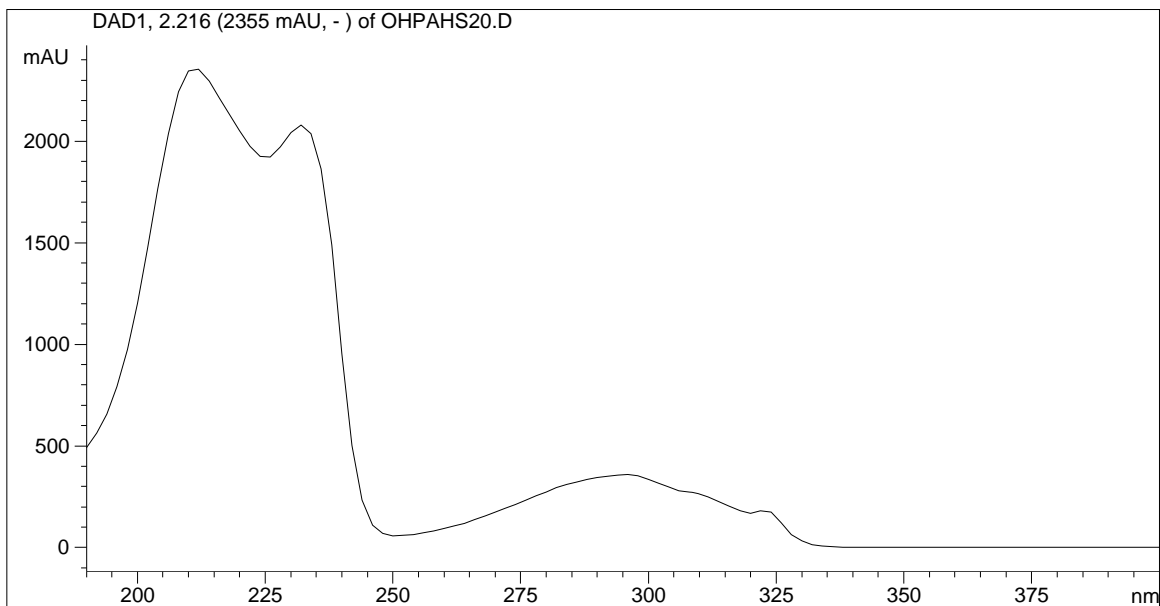


Figura A1-19. Espectro de UV del alfa-naftol. Concentración 80 mg/L

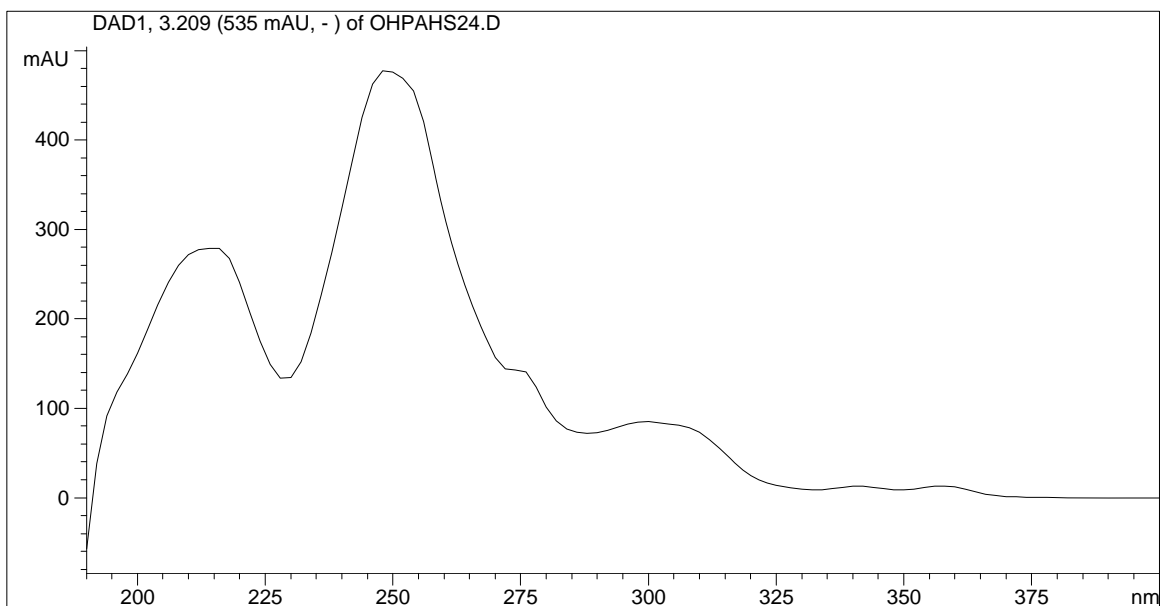


Figura A1-20. Espectro de UV del 9-fenantrol. Concentración 80 mg/L

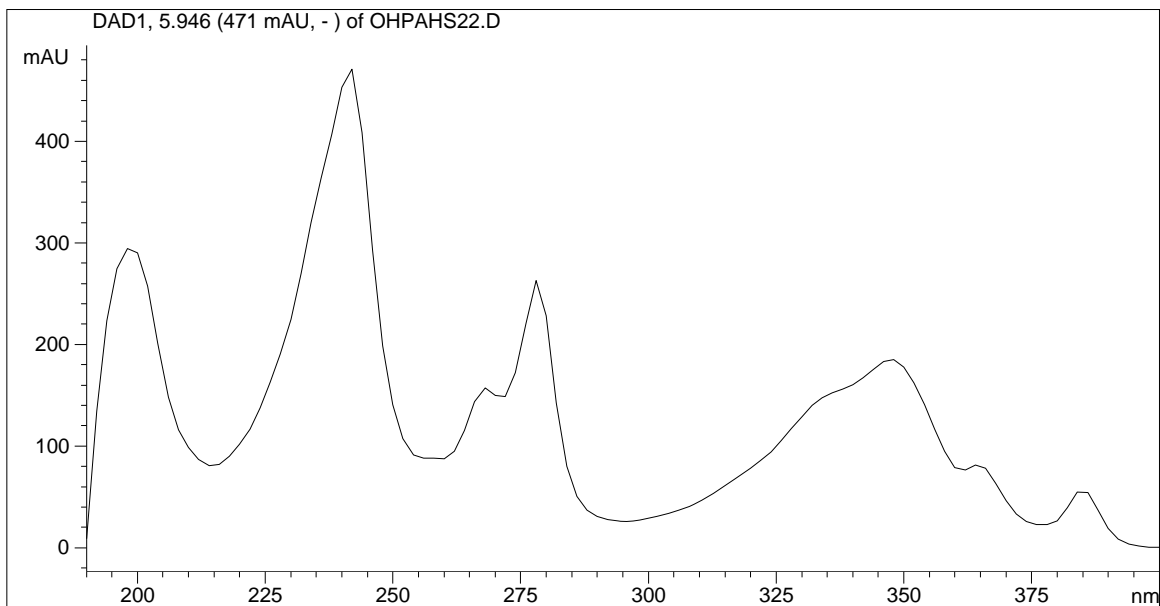


Figura A1-21. Espectro de UV del 1-hidroxipireno. Concentración 120 mg/L

APÉNDICE 2

Cromatogramas

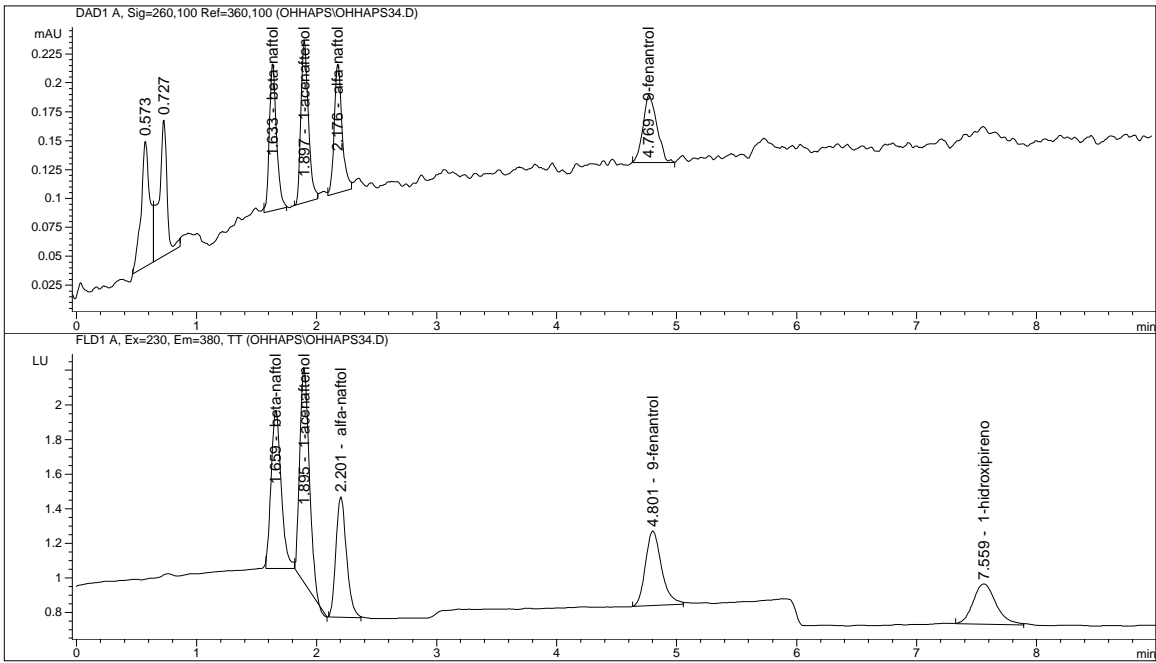


Figura A2-1. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de una mezcla estándar de hidroxí-HAPs. Concentración aproximada 0.1 mg/L.

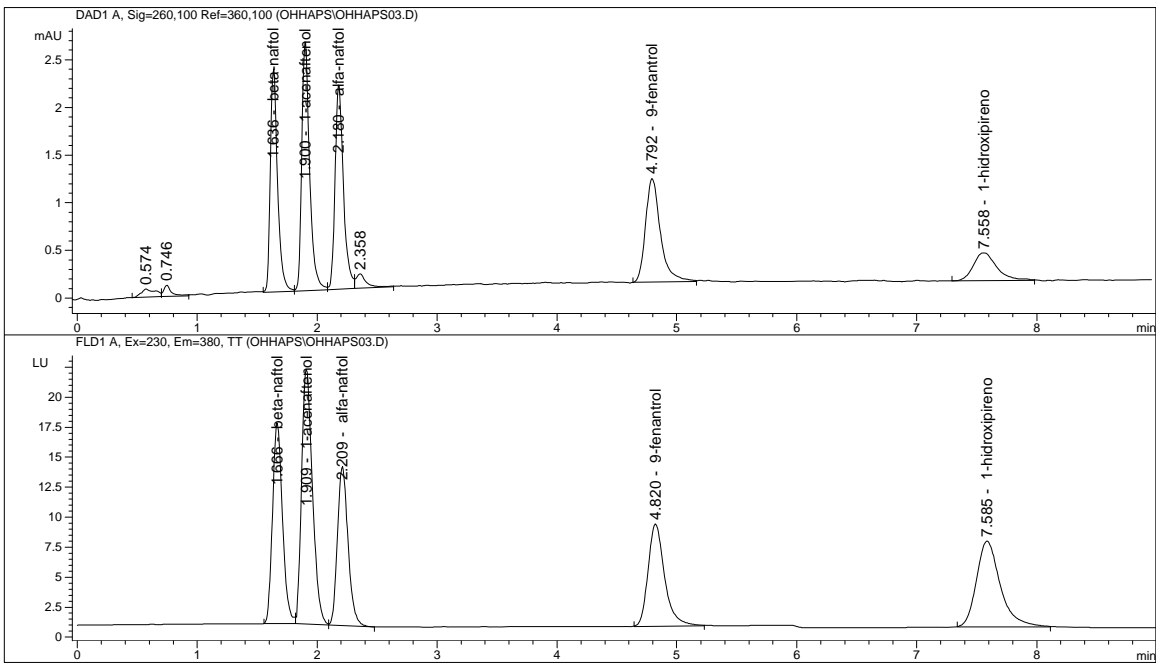


Figura A2-2. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de una mezcla estándar de hidroxí-HAPs. Concentración aproximada 2 mg/L.

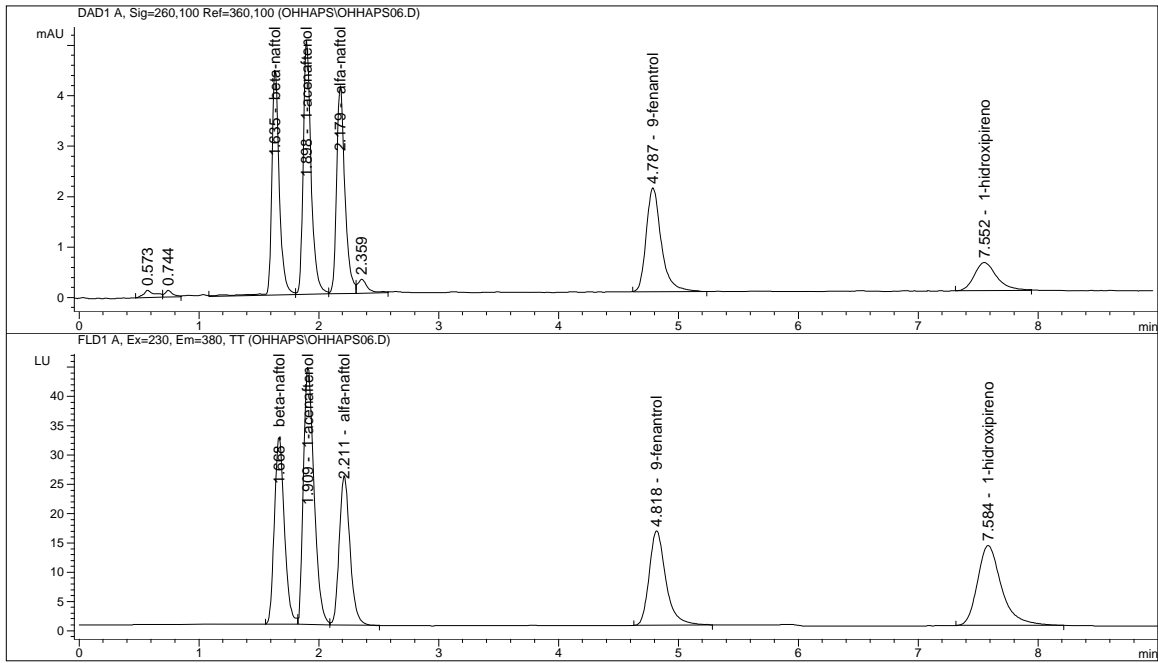


Figura A2-3. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de una mezcla estándar de hidroxi-HAPs. Concentración aproximada 4 mg/L.

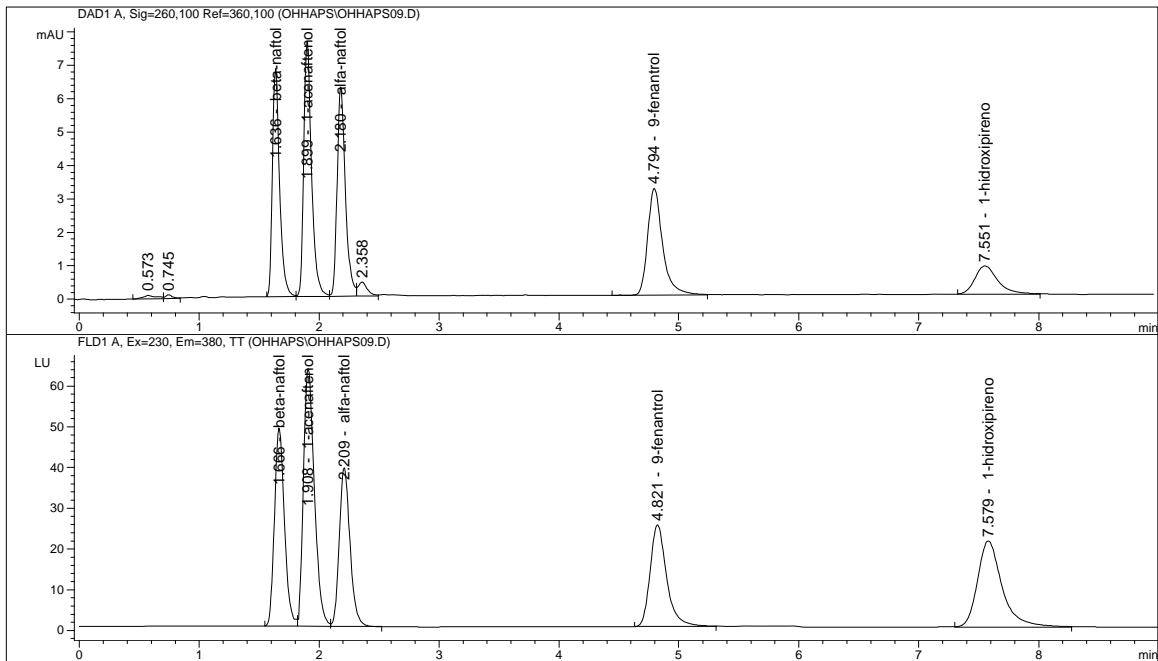


Figura A2-4. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de una mezcla estándar de hidroxi-HAPs. Concentración aproximada 6 mg/L.

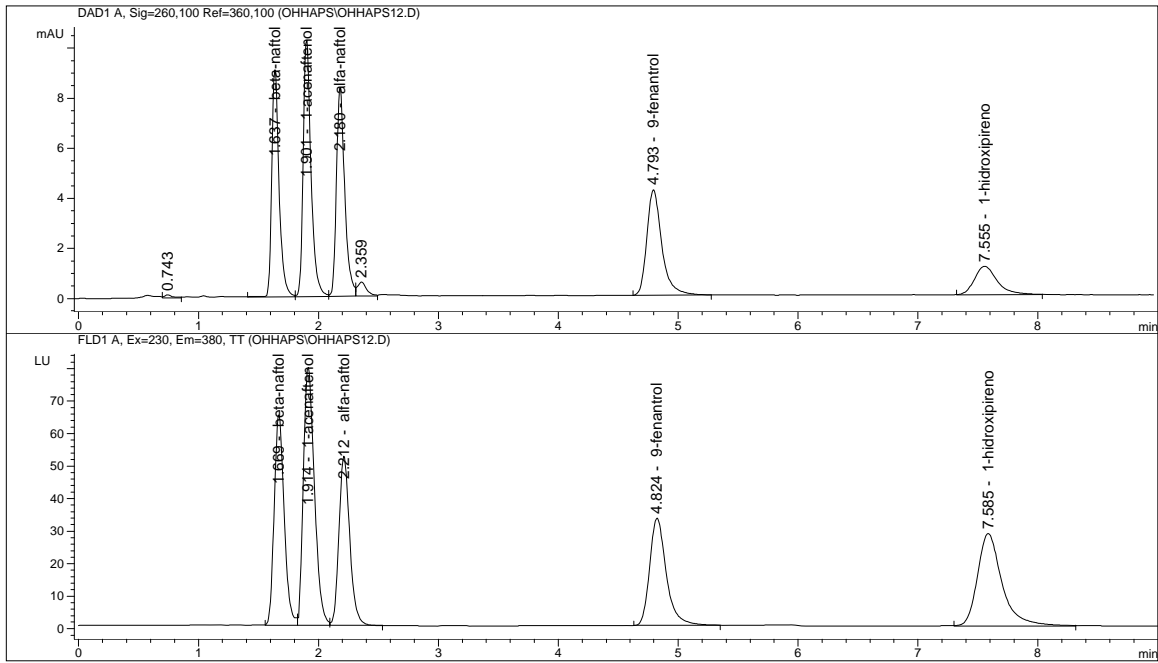


Figura A2-5. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de una mezcla estándar de hidroxi-HAPs. Concentración aproximada 8 mg/L.

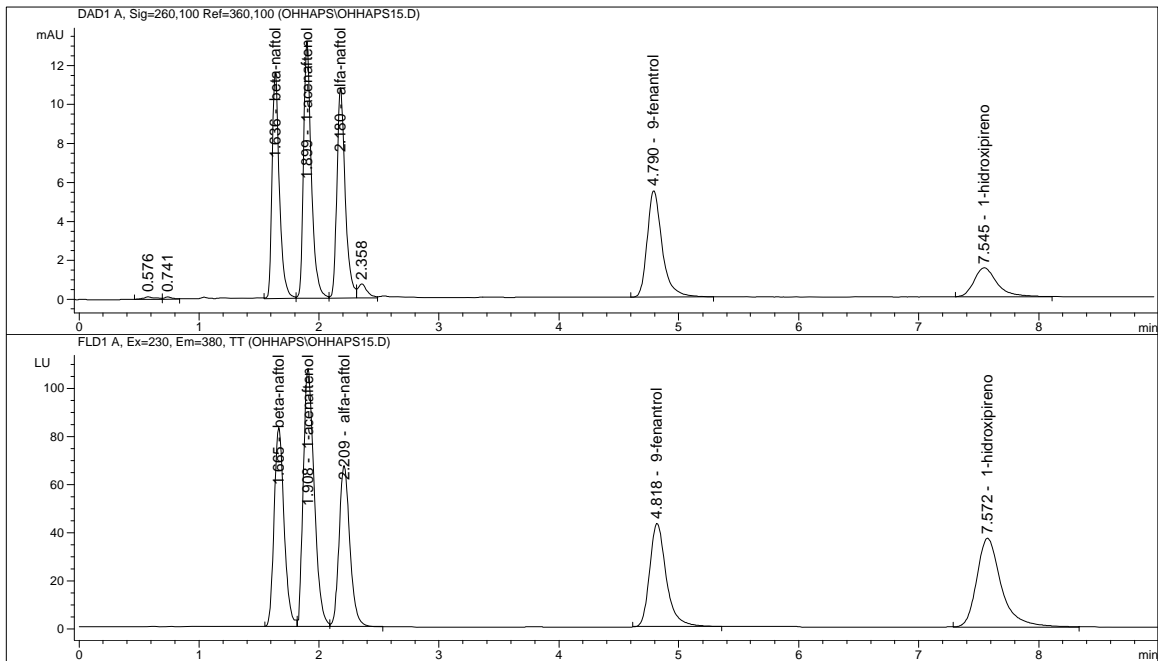


Figura A2-6. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de una mezcla estándar de hidroxi-HAPs. Concentración aproximada 10 mg/L.

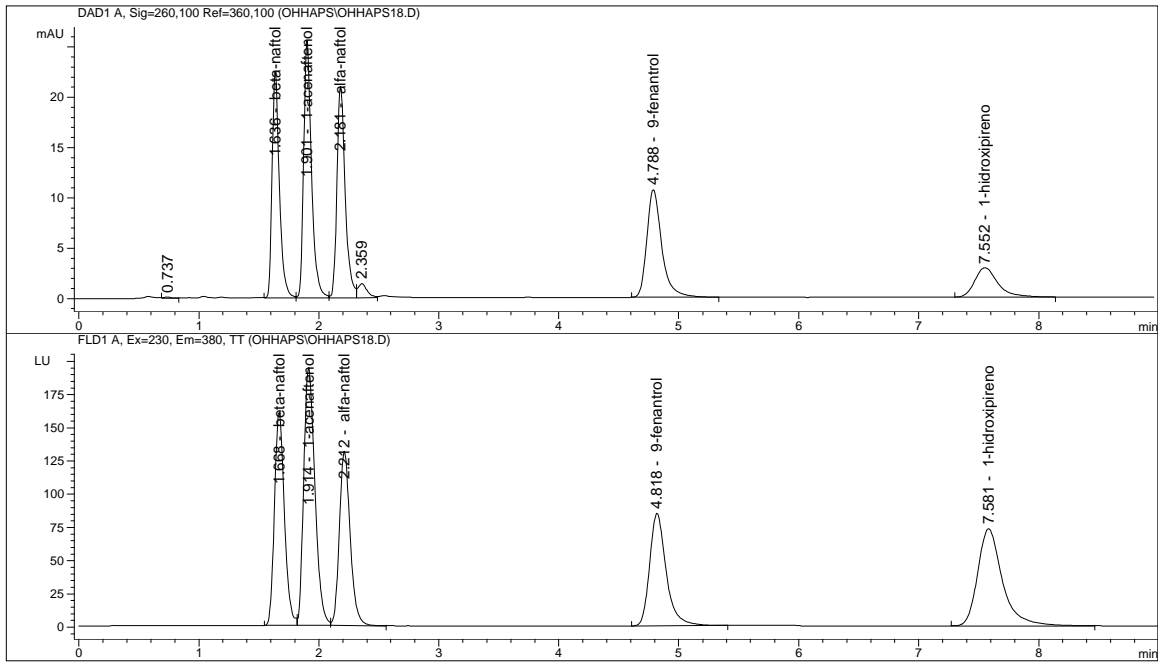


Figura A2-7. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de una mezcla estándar de hidroxi-HAPs. Concentración aproximada 20 mg/L.

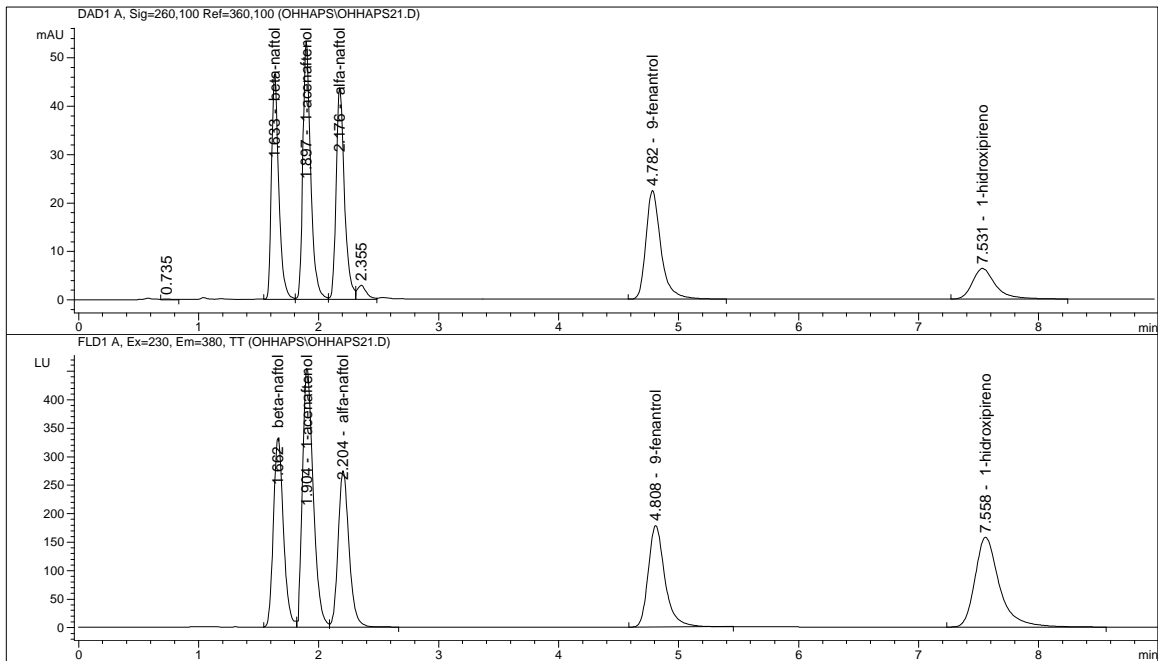


Figura A2-8. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de una mezcla estándar de hidroxi-HAPs. Concentración aproximada 40 mg/L.

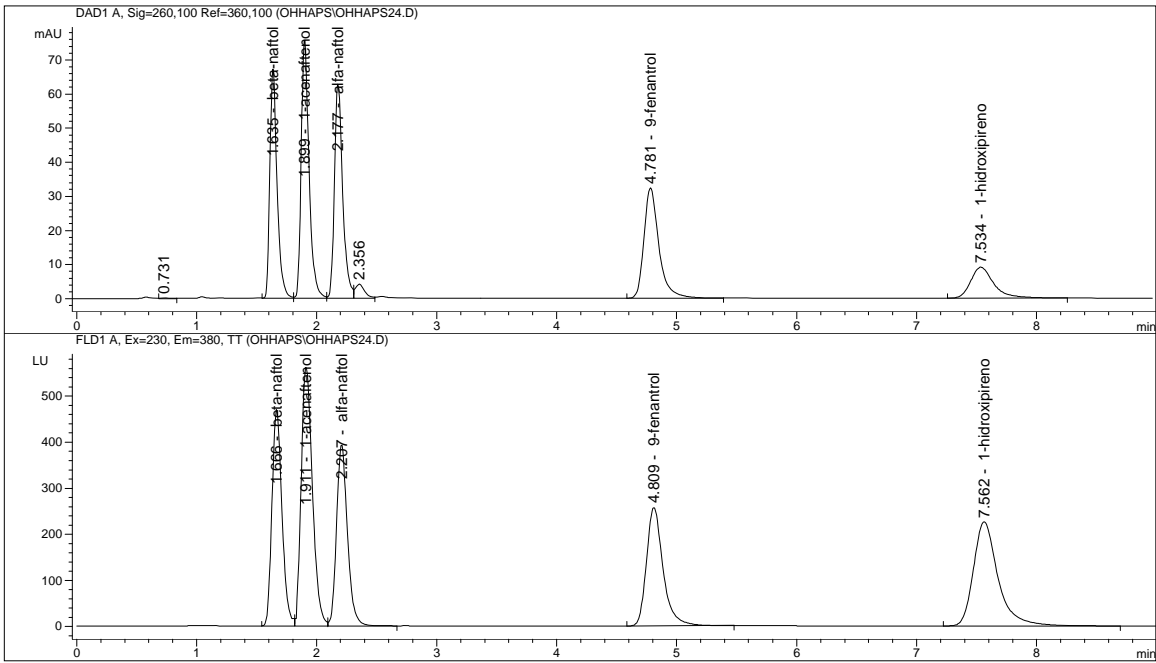


Figura A2-9. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de una mezcla estándar de hidroxi-HAPs. Concentración aproximada 60 mg/L.

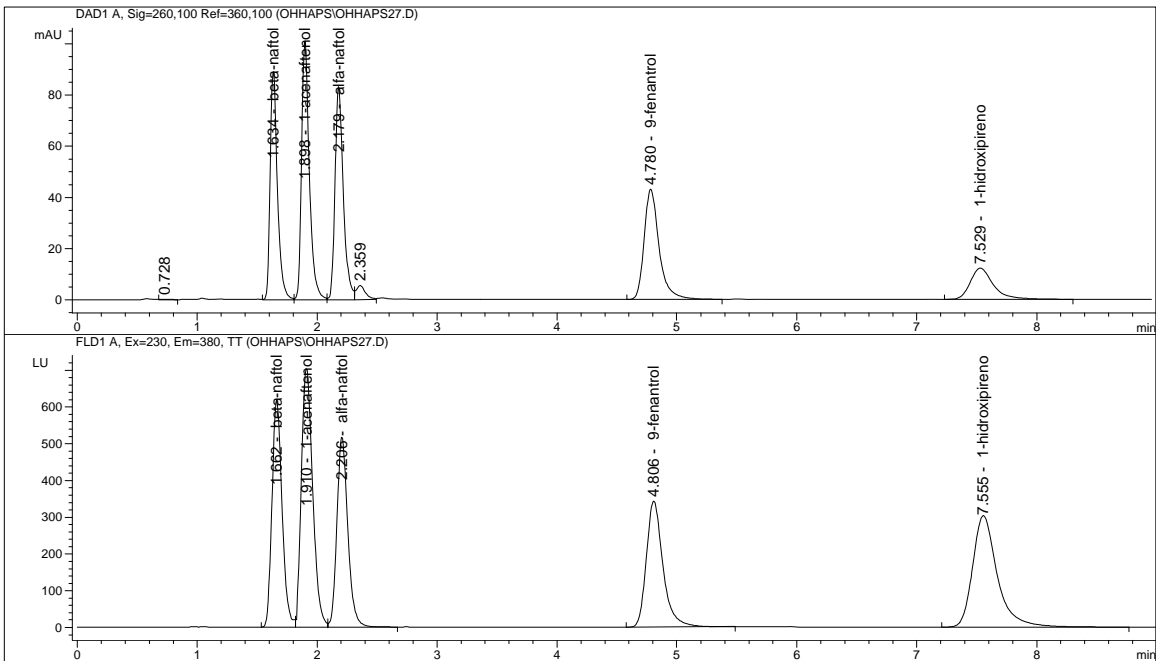


Figura A2-10. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de una mezcla estándar de hidroxi-HAPs. Concentración aproximada 80 mg/L.

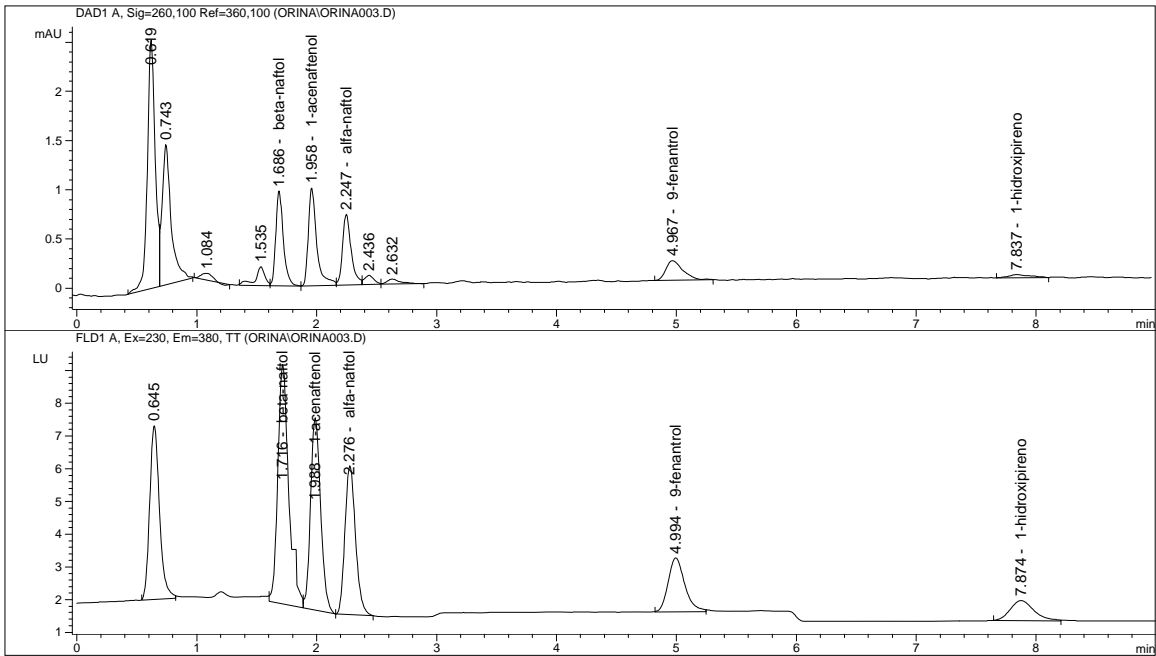


Figura A2-11. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de una muestra de orina fortificada con hidroxi-HAPs tratada por extracción en fase sólida. Concentración aproximada 0.1 mg/L.

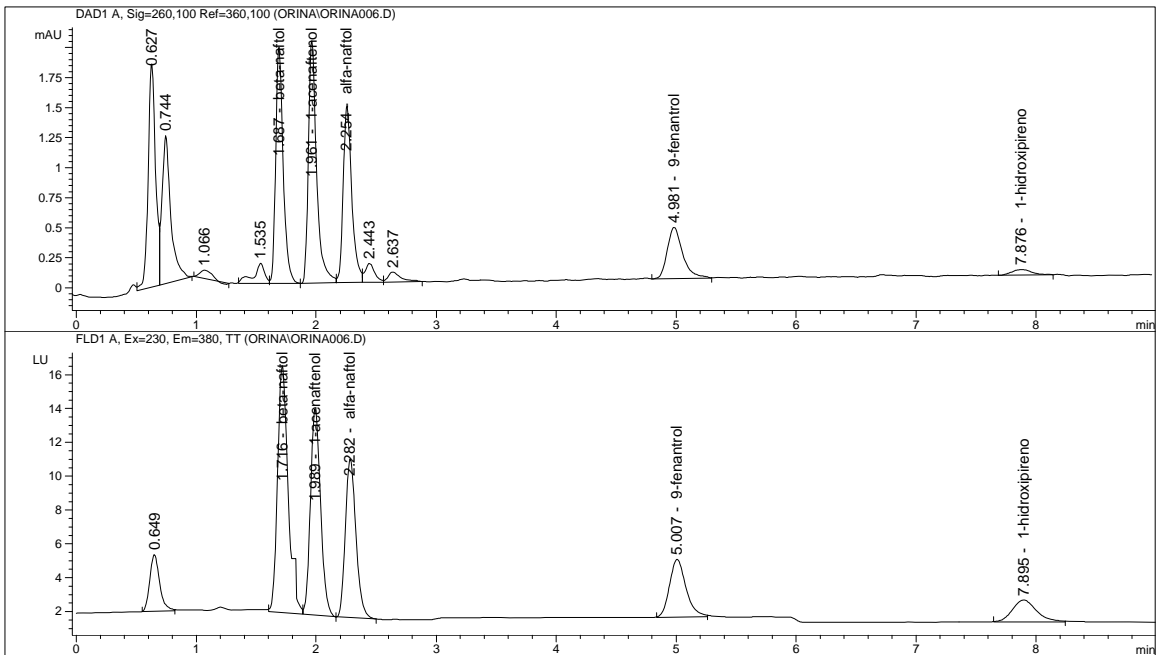


Figura A2-12. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de una muestra de orina fortificada con hidroxi-HAPs tratada por extracción en fase sólida. Concentración aproximada 0.2 mg/L.

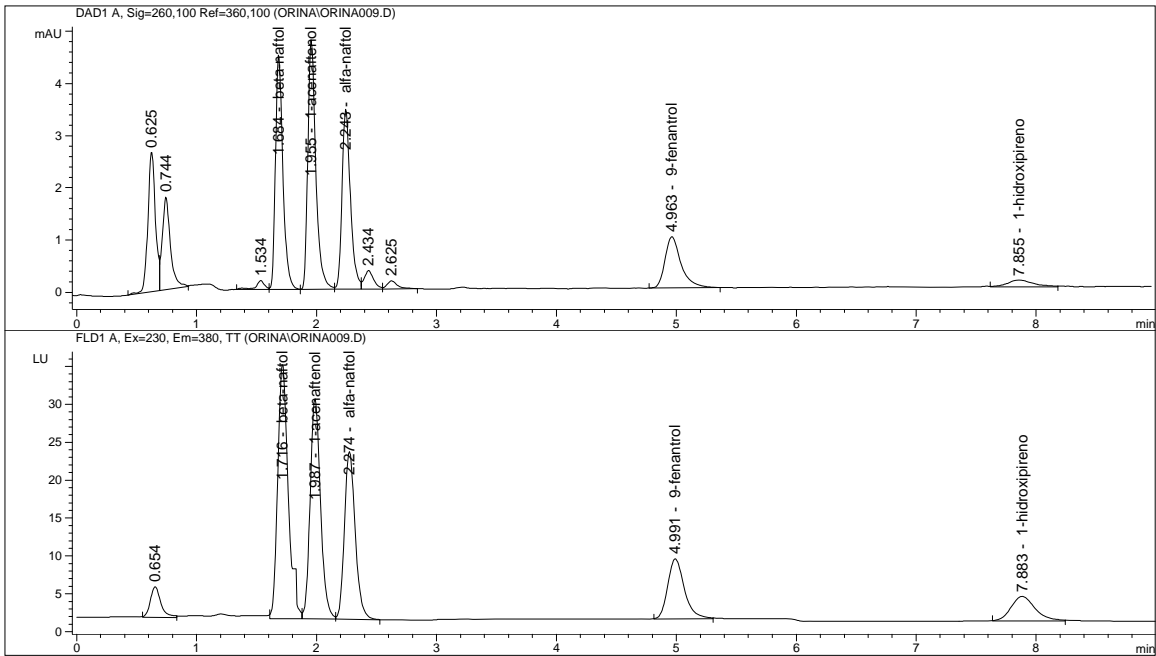


Figura A2-13. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de una muestra de orina fortificada con hidroxi-HAPs tratada por extracción en fase sólida. Concentración aproximada 0.45 mg/L.

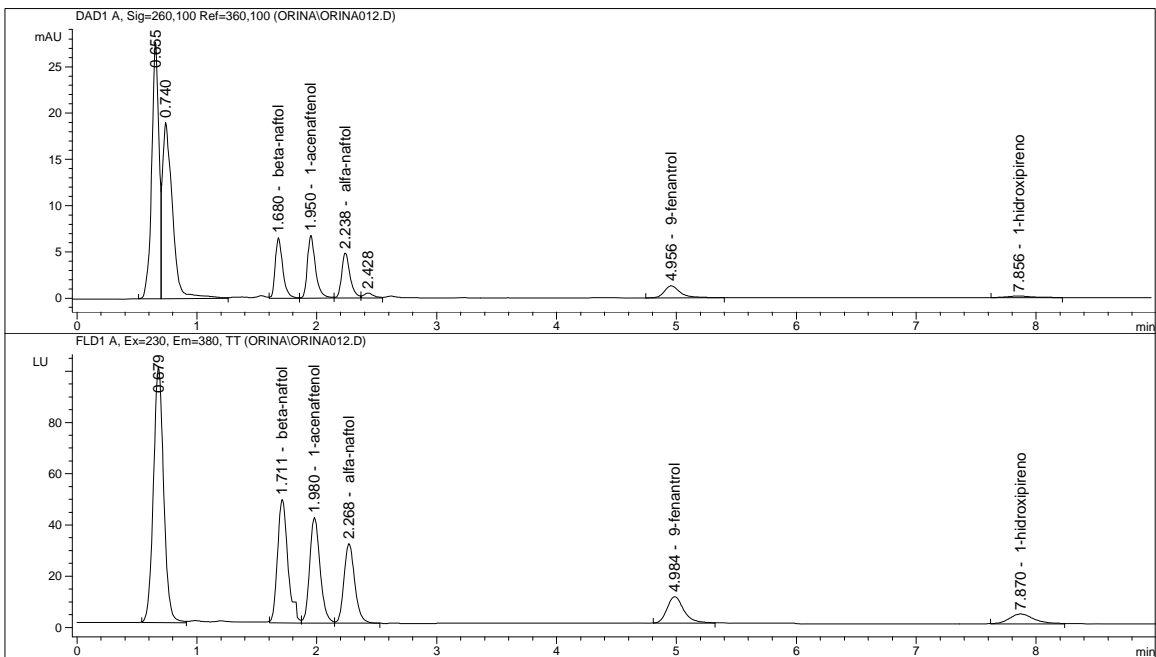


Figura A2-14. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de una muestra de orina fortificada con hidroxi-HAPs tratada por extracción en fase sólida. Concentración aproximada 0.7 mg/L.

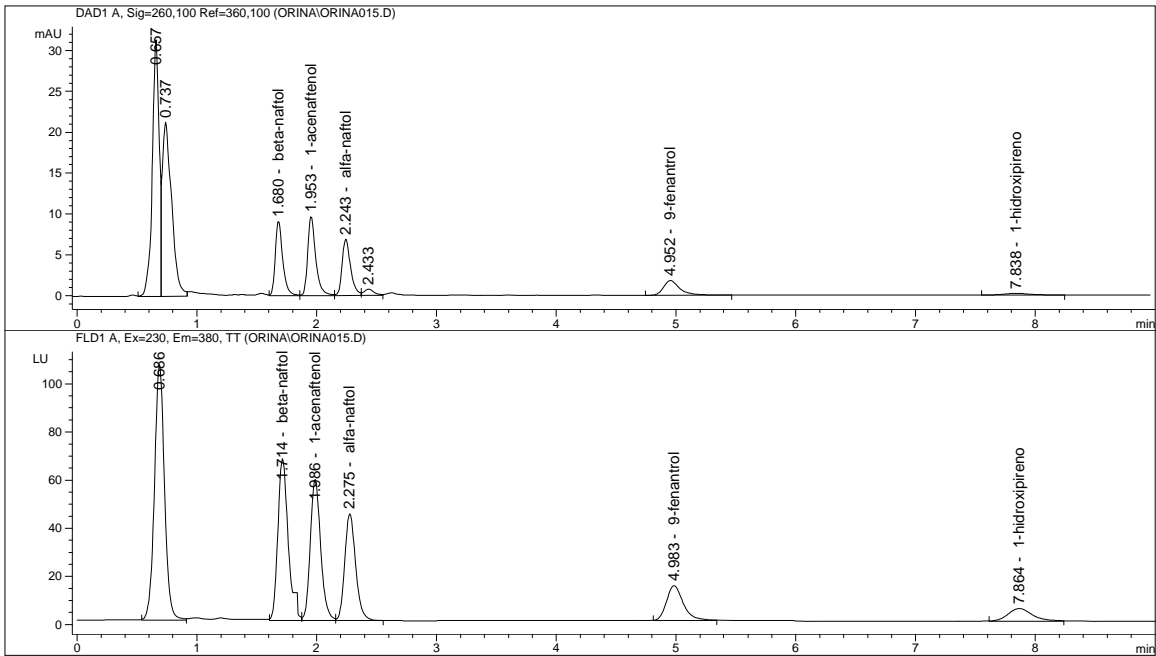


Figura A2-15. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de una muestra de orina fortificada con hidroxi-HAPs tratada por extracción en fase sólida. Concentración aproximada 1.0 mg/L.

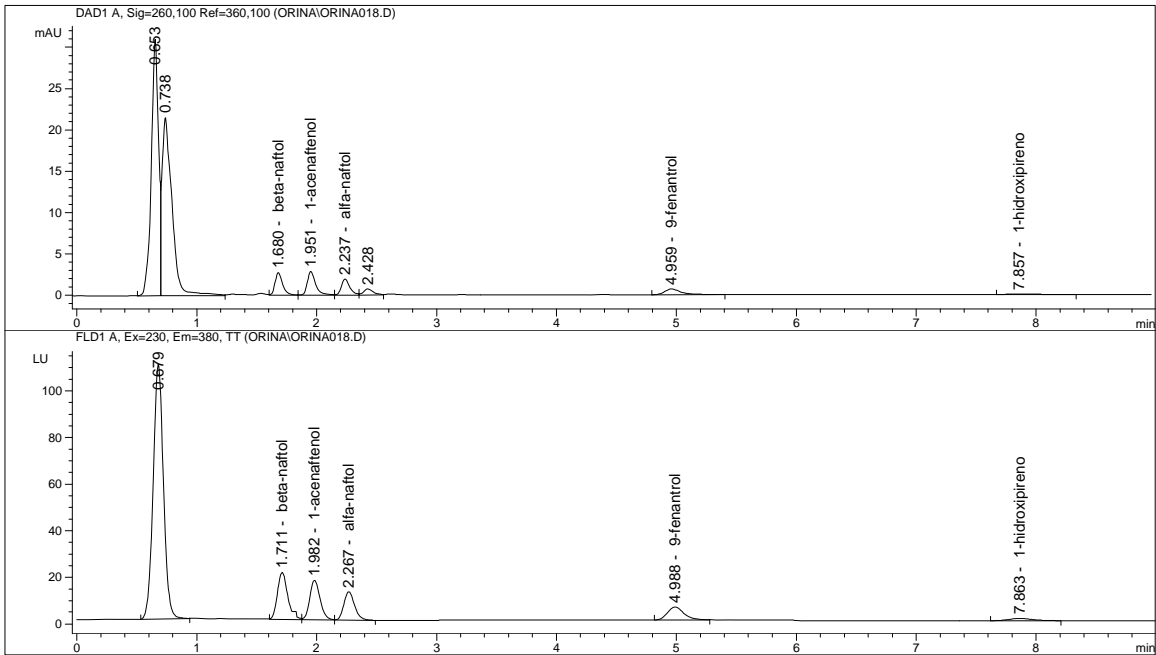


Figura A2-16. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de una muestra de orina fortificada con hidroxi-HAPs tratada por extracción en fase sólida. Concentración aproximada 0.28 mg/L. Estudio de precisión del método.

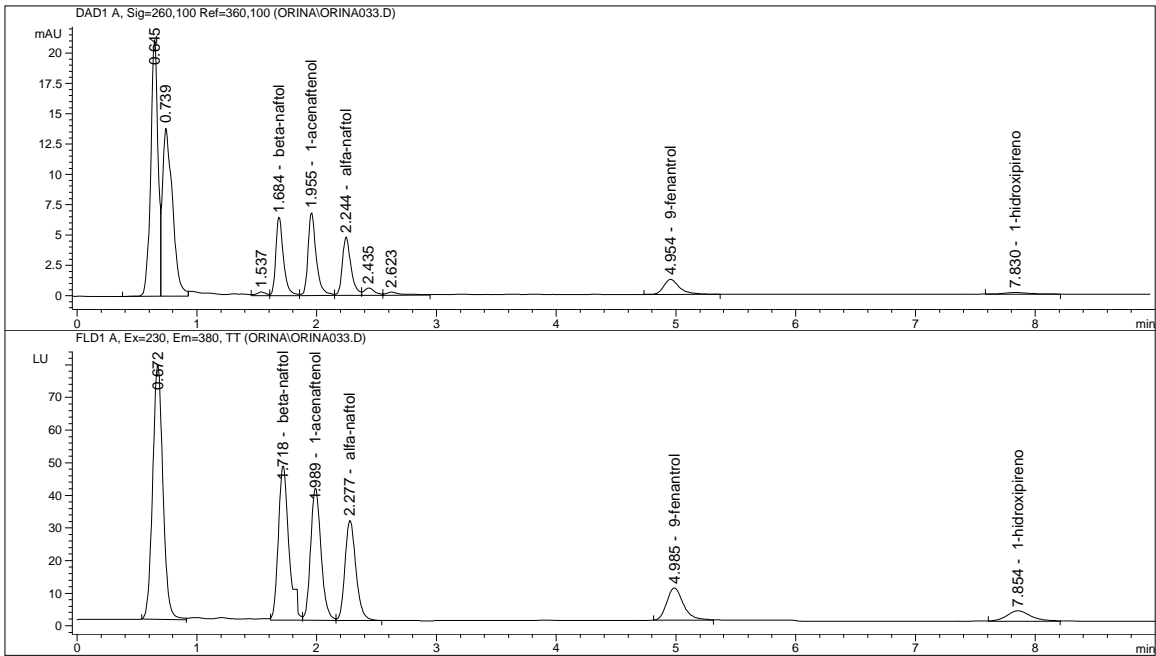


Figura A2-17. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de una muestra de orina fortificada con hidroxi-HAPs tratada por extracción en fase sólida. Concentración aproximada 0.82 mg/L. Estudio de precisión del método.

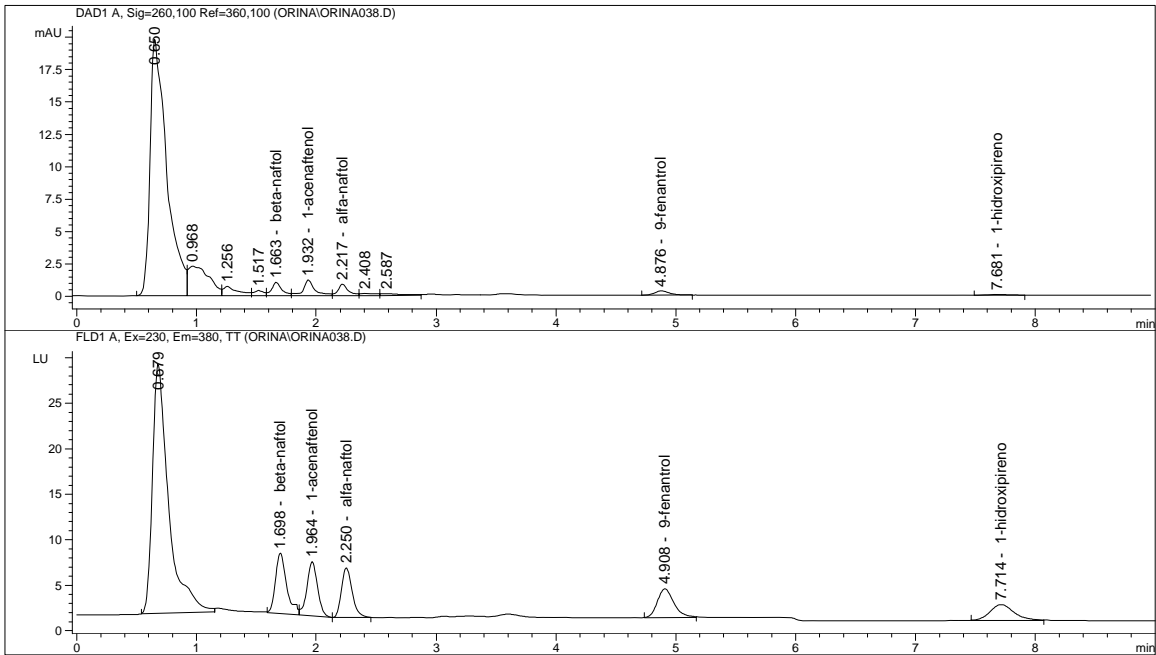
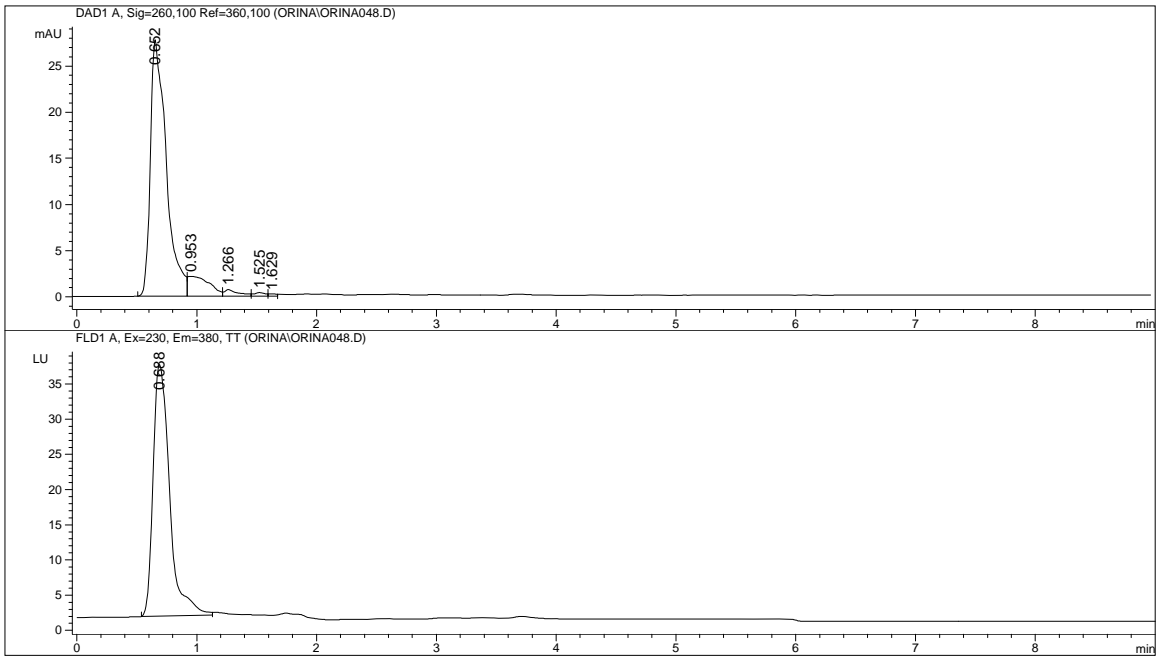
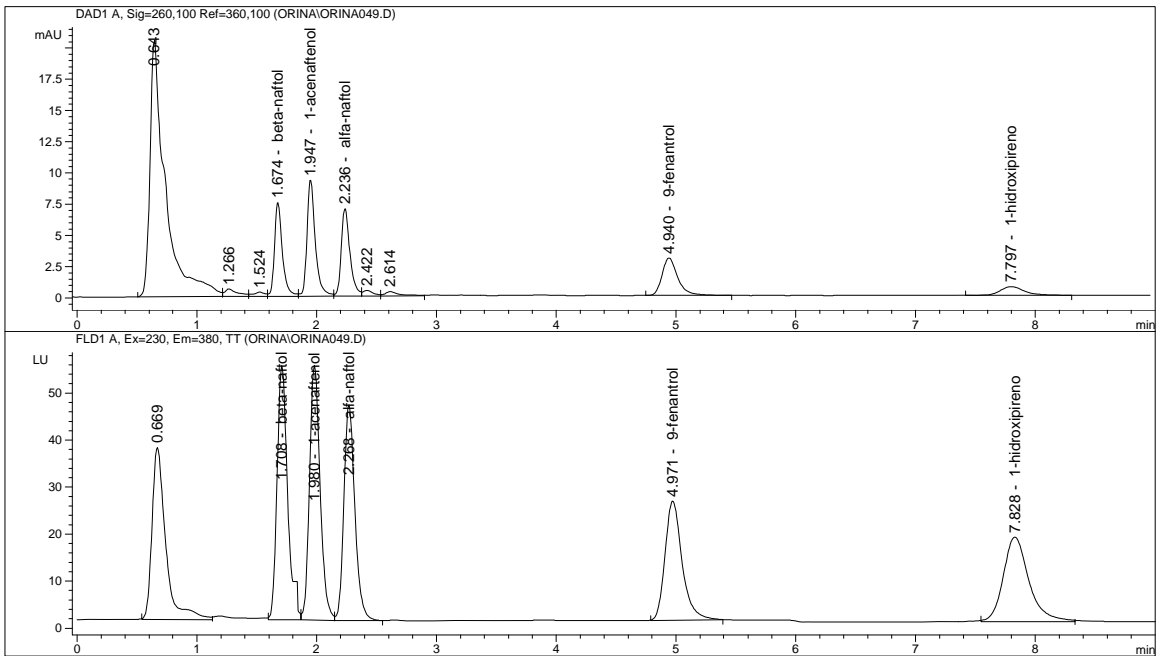


Figura A2-18. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de una muestra de orina fortificada con hidroxi-HAPs tratada por extracción en fase sólida. Concentración aproximada 0.1 mg/L. Estudio de limite de detección y cuantificación de método.

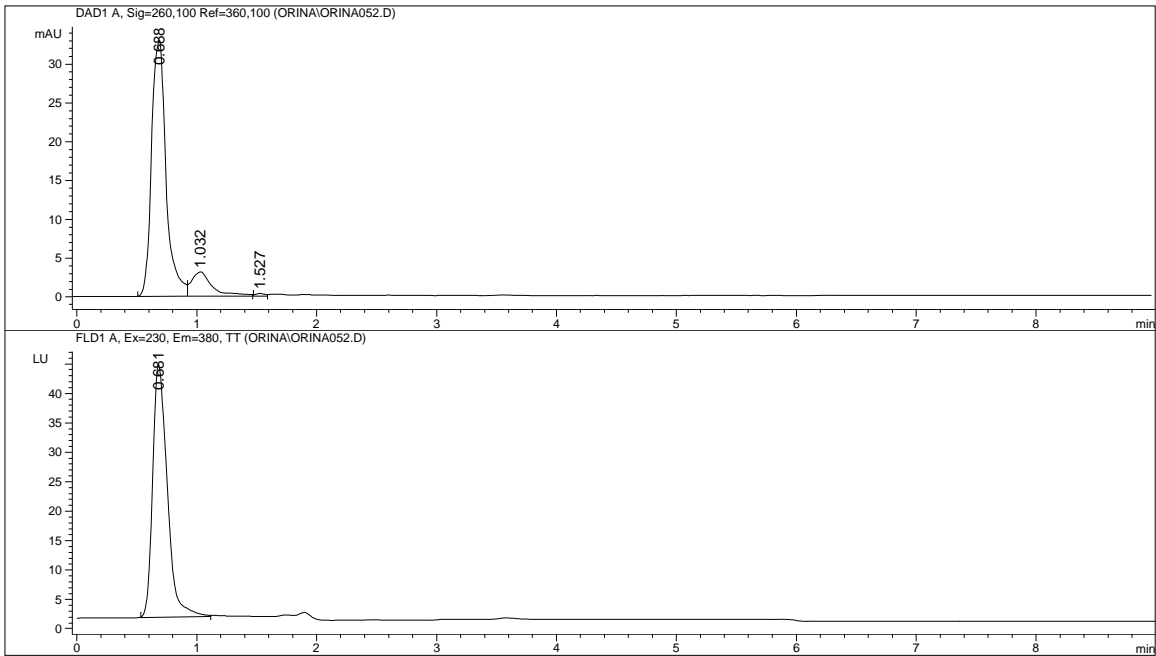


(a)

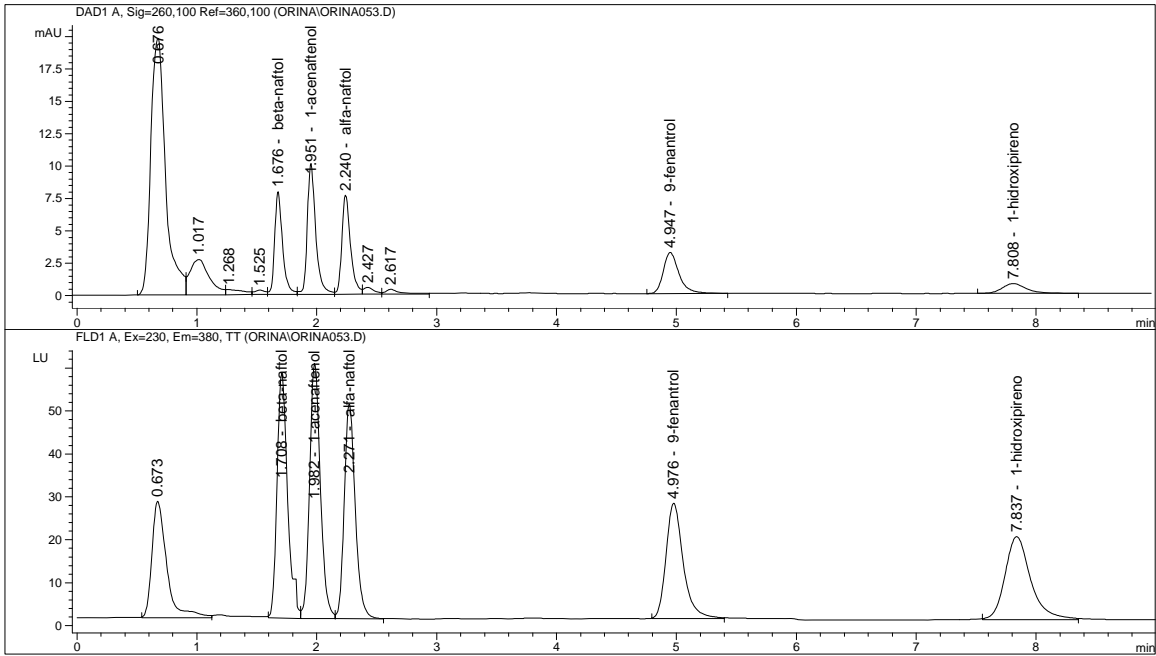


(b)

Figura A2-19. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de una muestra de orina tratada por extracción en fase sólida. (a) muestra blanco y (b) muestra fortificada con hidroxi-HAPs. Muestra identificada como M1 en la tabla 4.3.2

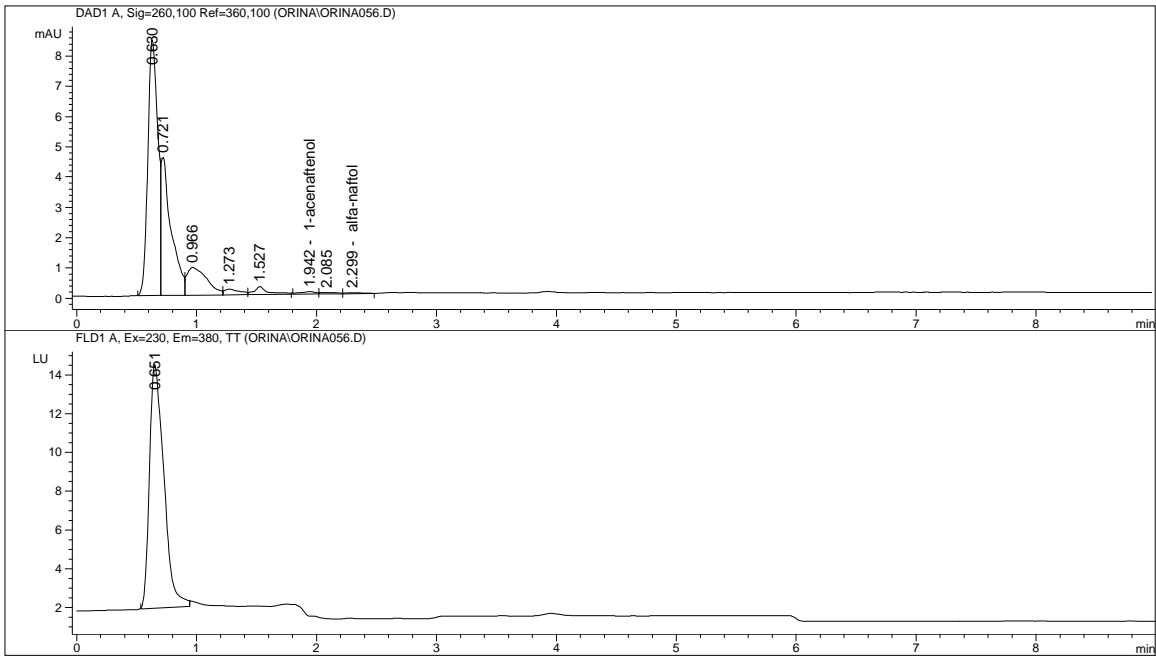


(a)

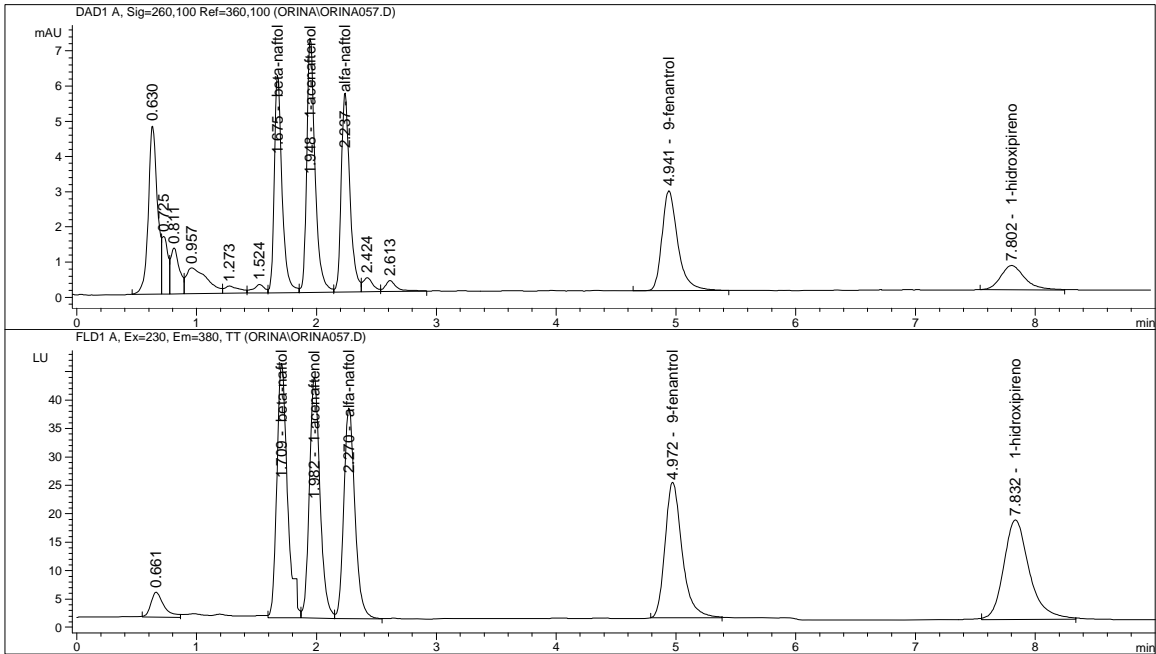


(b)

Figura A2-20. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de una muestra de orina tratada por extracción en fase sólida. (a) muestra blanco y (b) muestra fortificada con hidroxi-HAPs. Muestra identificada como M2 en la tabla 4.3.2



(a)



(b)

Figura A2-21. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de una muestra de orina tratada por extracción en fase sólida. (a) muestra blanco y (b) muestra fortificada con hidroxi-HAPs. Muestra identificada como M3 en la tabla 4.3.2

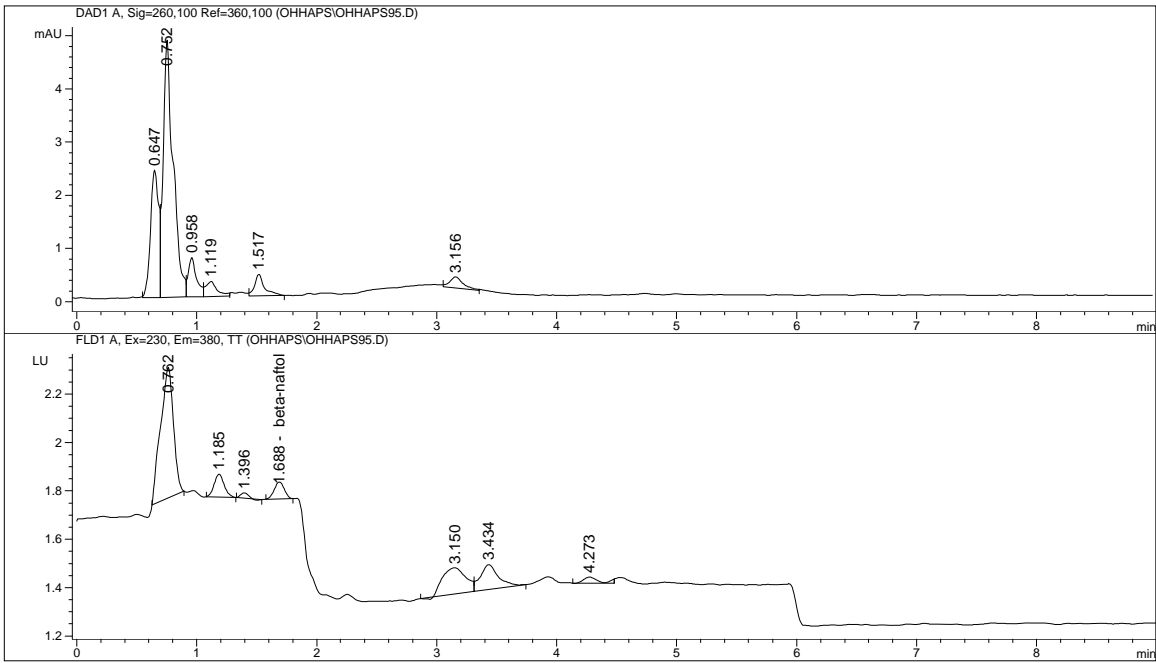


Figura A2-22. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de acetonitrilo grado cromatográfico tratado por extracción en fase sólida.

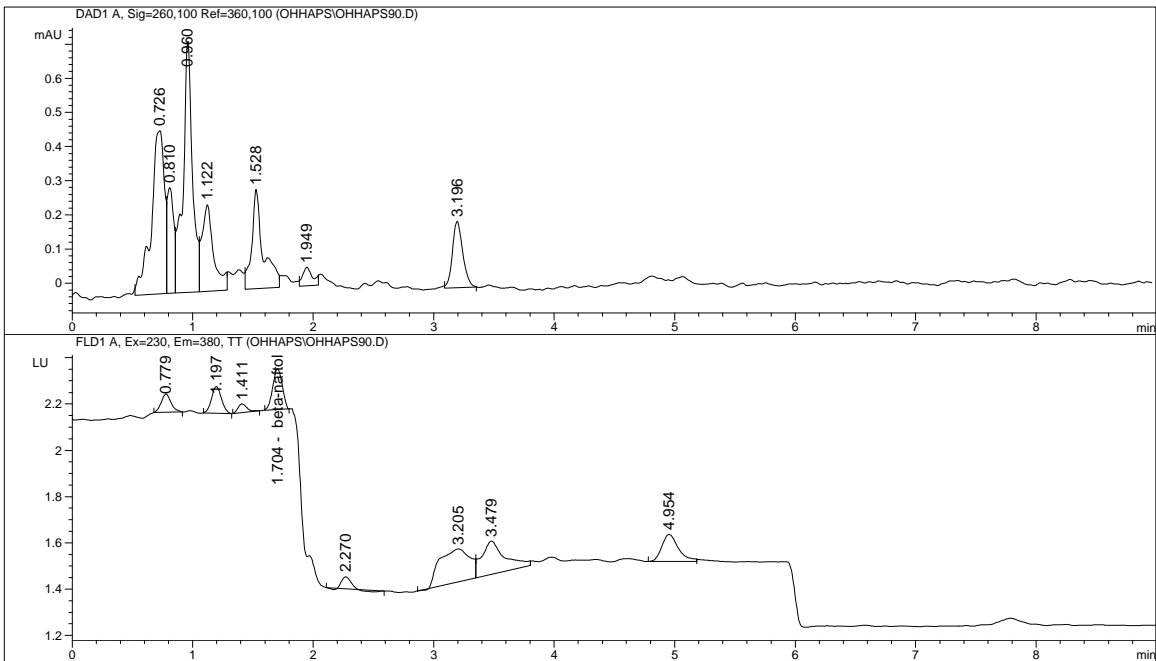


Figura A2-23. Cromatogramas CLAR-UV-FL obtenidos de la inyección de agua destilada tratada por extracción en fase sólida.

APÉNDICE 3

Tablas de concentraciones

Tabla A3-1 Concentración real de cada HAP en las disoluciones utilizadas para las curvas de calibración.

<i>Compuesto</i>	<i>Concentración (mg/L)</i>										
	50	40	30	20	10	8	6	4	2	1	0.5
Acenafteno	50	40	30	20	10	8	6	4	2	1	0.5
Acenaftileno	52	41.6	31.2	20.8	10.4	8.32	6.24	4.16	2.08	1.04	0.52
Antraceno	58	46.4	34.8	23.2	11.6	9.28	6.96	4.64	2.32	1.16	0.58
Benz(e)acefenantrileno	40	32	24	16	8	6.4	4.8	3.2	1.6	0.8	0.4
1,2-benzantraceno	52	41.6	31.2	20.8	10.4	8.32	6.24	4.16	2.08	1.04	0.52
Benzo(k)fluoranteno	40	32	24	16	8	6.4	4.8	3.2	1.6	0.8	0.4
Benzo(a)pireno	48	38.4	28.8	19.2	9.6	7.68	5.76	3.84	1.92	0.96	0.48
Bifenilo	48	38.4	28.8	19.2	9.6	7.68	5.76	3.84	1.92	0.96	0.48
Criseno	46	36.8	27.6	18.4	9.2	7.36	5.52	3.68	1.84	0.92	0.46
1,2:5,6-dibenzantraceno	48	38.4	28.8	19.2	9.6	7.68	5.76	3.84	1.92	0.96	0.48
Fenantreno	48	38.4	28.8	19.2	9.6	7.68	5.76	3.84	1.92	0.96	0.48
Fluoranteno	50	40	30	20	10	8	6	4	2	1	0.5
Fluoreno	50	40	30	20	10	8	6	4	2	1	0.5
Indeno	50	40	30	20	10	8	6	4	2	1	0.5
Naftaleno	54	43.2	32.4	21.6	10.8	8.64	6.48	4.32	2.16	1.08	0.54
Pireno	44	35.2	26.4	17.6	8.8	7.04	5.28	3.52	1.76	0.88	0.44

Tabla A3-2 Concentración real de cada hidroxí-HAP en las disoluciones utilizadas para las curvas de calibración.

<i>Compuesto</i>	<i>Concentración (mg/L)</i>															
	106	84.8	63.6	42.4	21.2	10.6	8.46	6.36	4.24	2.12	1.06	0.636	0.424	0.212	0.106	0.053
1-acenaftenol	106	84.8	63.6	42.4	21.2	10.6	8.46	6.36	4.24	2.12	1.06	0.636	0.424	0.212	0.106	0.053
9-fenantrol	96	76.8	57.6	38.4	19.2	9.6	7.68	5.76	3.84	1.92	0.96	0.576	0.384	0.192	0.096	0.048
α -naftol	106	84.8	63.6	42.4	21.2	10.6	8.46	6.36	4.24	2.12	1.06	0.636	0.424	0.212	0.106	0.053
β -naftol	102	81.6	61.2	40.8	20.4	10.2	8.16	6.12	4.08	2.04	1.02	0.612	0.408	0.204	0.102	0.051
1-hidroxipireno	94	75.2	56.4	37.6	18.8	9.4	7.52	5.64	3.76	1.88	0.94	0.564	0.376	0.188	0.094	0.047

Tabla A3-3 Concentración real de cada hidroxi-HAP en las disoluciones utilizadas para las curvas de calibración en orina.

<i>Compuesto</i>	<i>Concentración (mg/L)</i>						
1-acenafténol	1.0	0.82	0.7	0.45	0.28	0.2	0.1
9-fenantrol	0.96	0.79	0.67	0.43	0.27	0.19	0.1
α -naftol	0.96	0.79	0.67	0.43	0.27	0.19	0.1
β -naftol	1.0	0.82	0.7	0.45	0.28	0.2	0.1
1-hidroxipireno	1.12	0.92	0.78	0.5	0.31	0.22	0.11

APÉNDICE 4

Cálculo de límite de detección
y límite de cuantificación

4-A. Cálculo del límite de detección y límite de cuantificación.

(Considerando Área de pico)

Si existe una relación lineal entre la señal analítica (y) y la concentración del analito (x), la "mejor" línea recta que pasa a través de los puntos de la curva de calibración se calcula por el método de los mínimos cuadrados.

Cada uno de los puntos de la gráfica está sujeto a un error experimental. El método de mínimos cuadrados supone que todos los errores se encuentran en y , lo que provoca que haya desviaciones en esta dirección entre los puntos experimentales y la recta calculada. Algunas de esas desviaciones (conocidas como los residuos de y) serán positivas y otras negativas, por lo que se intenta minimizar la suma de los cuadrados de los residuos. La recta se calcula basándose en el principio de que "la línea debe pasar por el centro de gravedad de los puntos (\bar{x}, \bar{y}) ".

Para la recta

$$y = a + bx \quad \text{ecuación 1}$$

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{ecuación 2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad \text{ecuación 3}$$

Para calcular los errores aleatorios de los valores de la pendiente y de la ordenada al origen, primero se calcula el valor de $S_{y/x}$ (desviación estándar sobre la regresión) con la relación:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - y_{calc})^2}{n-2}} \quad \text{ecuación 4}$$

Las desviaciones estándar sobre la pendiente (b) y sobre la ordenada al origen (a) están dadas por:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{ecuación 5}$$

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{ecuación 6}$$

Para estimar si los puntos experimentales se ajustan bien o no a una línea recta, se calcula el coeficiente de correlación momento-producto, r :

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{\left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right]}} \quad \text{ecuación 7}$$

Para calcular el límite de detección es necesario conocer los intervalos de confianza sobre la recta calculada:

$$y_{\pm} = \bar{y} + b(x_i - \bar{x}) \pm t S_{y/x} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{ecuación 8}$$

en donde t es el valor de la "t de student", a dos colas, con un nivel de confianza s para $n-2$ grados de libertad.

Se calcula primero el valor de y_+ para $x_i = 0$. Con este valor se calcula el valor correspondiente de x en la recta y_- . Para despejar el valor de x de las ecuaciones de las rectas y_{\pm} se utiliza un término auxiliar C :

$$C = b^2 - \frac{(t * S_{y/x})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{ecuación 9}$$

por lo que, para la recta y_+

$$x_1 = \bar{x} - \frac{b}{C}(\bar{y} - y_o) - \frac{tS_{y/x}}{C} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right)C + \frac{(y_o - \bar{y})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{ecuación 10}$$

y para la recta y_-

$$x_2 = \bar{x} - \frac{b}{C}(\bar{y} - y_o) + \frac{tS_{y/x}}{C} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right)C + \frac{(y_o - \bar{y})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{ecuación 11}$$

Entonces, el límite de detección se obtiene sustituyendo el valor calculado de y_+ para $x=0$ en la ecuación 11.

Para calcular el límite de cuantificación, se calcula ahora el valor de y_+ para $x=LD$, y nuevamente con este valor se calcula el valor de x en la recta y_- . Este valor corresponde al límite de cuantificación.

4-B. Cálculo del límite de detección y límite de cuantificación.

(Considerando Altura de pico)

Para determinar los límites de detección y cuantificación con los datos de altura se tomó el valor del ruido en un intervalo entre 3 y 4 minutos, tiempo en el cual no se obtiene ninguna señal y no hay ningún cambio de longitud de onda de emisión ni excitación. Este valor de ruido se multiplicó por 3 para obtener el límite de detección y por 10 para obtener el límite de cuantificación, obteniéndose el valor medio de dichos límites en unidades de fluorescencia (señal). Asumiendo que el valor de señal a una concentración de cero tiene una distribución normal, el valor medio se multiplicó por 2 para obtener los valores a un nivel de significancia mayor a 95%.

Por último, para obtener los valores de LD y LC en unidades de concentración, los valores obtenidos en unidades de fluorescencia se dividieron entre la pendiente de la recta correspondiente a cada compuesto.