



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTANDARIZACIÓN DE UN NUEVO MÉTODO DE EXTRACCIÓN A MICROESCALA
EMPLEANDO UNA CELDA ASISTIDA POR ULTRASONIDO PARA LA
DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN
PARTÍCULAS EMITIDAS POR LA COMBUSTIÓN DE DIESEL Y BIODIESEL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUIMICA

PRESENTA

GRACIELA LIZETT SANTOS MEDINA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2012



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Josefina de Gyves y Marciniak

VOCAL: Profesor: Maria del Pilar Cañizares Macías

SECRETARIO: Profesor: Omar Amador Muñoz

1er. SUPLENTE: Profesor: Silvia Citlalli Gama Gonzalez

2° SUPLENTE: Profesor: Carolina Flores Ávila

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA

ASESOR DEL TEMA: DR. OMAR AMADOR MUÑOZ

SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. BRENDA LÍZ VALLE HERNÁNDEZ

SUSTENTANTE: GRACIELA LIZETT SANTOS MEDINA

Agradecimientos Técnicos

Al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal a través de su proyecto PICS08-31 por la beca otorgada.

A los proyectos 23600 de CONACYT-SEMARNAT, PAPIIT IN116810-3 de la UNAM por el financiamiento para el desarrollo de la investigación.

Al Dr. Omar Amador Muñoz por la dirección de la tesis, el asesoramiento en el funcionamiento de los equipos y en el análisis estadístico.

Al Dr. Arón Jazcilevich Diamant por la oportunidad de formar parte del proyecto.

Al Dr. Rafael de Jesús Villalobos y Pietrini por la oportunidad de realizar esta tesis en la Sección de Mutagénesis Ambiental.

A la M. en C. Brenda Líz Valle Hernández por la colaboración, supervisión y asesoría durante el desarrollo de la tesis.

A las profesoras Josefina de Gyves y Marciniak y Ma. Del Pilar Cañizares Macías por la revisión del presente escrito y por sus acertadas recomendaciones.

A los químicos: Maribel Hernández C., Enrique Hernández L., Jairo Vázquez S. y Yessica Flores A. por su apoyo en el análisis instrumental y manejo del software utilizado.

A los tesisistas: Marisol Romero., Griselda Maya., Estela Flores O., Geraldine González R. y Guadalupe Zitlalpopoca H por su apoyo en la recolección y tratamiento de las muestras.

Gracias

*A mis padres Luz Elena Medina Concebida y Alejandro Santos Espinoza,
por su incondicional apoyo y por su ejemplo de amor y perseverancia.*

A mis hermanos Ale y Lucy, por su compañía y por todo lo compartido.

*A todas mis amistades, por todas las palabras de aliento que siempre
han tenido para mí.*

*A los que ya no están o se encuentran lejos, por las enseñanzas y el
cariño que me regalaron.*

ÍNDICE

i	Resumen	1
1	Introducción	3
2	Marco Teórico	3
	2.1 Contaminación Atmosférica	3
	2.1.1 Partículas suspendidas atmosféricas	5
	2.2 Compuestos Aromáticos Policíclicos	7
	2.3 Combustibles	10
	2.3.1 Diesel	10
	2.3.2 Biodiesel	11
	2.4 Química Verde	13
	2.4.1 Química analítica verde	15
	2.5 Química a microescala	17
	2.6 Técnicas de extracción	18
	2.6.1 Extracción por Soxhlet	18
	2.6.2 Extracción por fluidos supercríticos (EFS)	20
	2.6.3 Extracción por fluidos presurizados EFP (extracción acelerada con disolvente)	22
	2.6.4 Extracción asistida por microondas	24
	2.6.5 Extracción asistida por ultrasonido	25
	2.7 Validación de métodos analíticos	27
3	Objetivos	31
4	Desarrollo experimental	32
	4.1 Celda de extracción a microescala asistida por ultrasonido acoplada a un sistema de filtración con y sin reflujo (CEMAUF–R/SR) diseñada en el laboratorio	32
	4.2 Evaluación de las variables de operación	33
	4.2.1. Evaluación del número de extracciones	36
	4.2.2. Evaluación del efecto de la temperatura	36
	4.2.3. Técnica de reducción	37
	4.2.4 Sistema abierto y cerrado	38
	4.3 Estandarización del método	39
	4.3.1 Análisis cualitativo	40
	4.3.1.1 Estándares	40
	...4.3.1.2 Identificación	41
	4.3.2 Análisis cuantitativo	41
	4.3.2.1 Preparación de las disoluciones “stock”	42
	4.3.2.2 Preparación de las disoluciones madre, de trabajo y de fortificación para las curvas de calibración	44
	4.3.3. Tratamiento de la muestra	53
	4.3.3.1 Colecta y preservación de las muestras empleadas como matriz para la estandarización	53
	4.3.3.2 Preparación de la matriz	54
	4.3.3.3 Fortificación de los filtros para la extracción de la curva de método	54
	4.3.3.4 Procedimiento de extracción	54

Índice

4.3.4	Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de Masas (CG-EM)	57
4.3.5	Determinación de los parámetros de estandarización del método	57
4.3.5.1	Intervalo lineal de trabajo y precisión	57
4.3.5.2	Homocedasticidad	58
4.3.5.3	Regresión lineal ponderada	59
4.3.5.4	Límites de cuantificación y de detección	62
4.3.5.5	Evaluación de la eficiencia por el método de adiciones patrón sobre matriz	62
4.3.6	Aplicación del método analítico para determinar HAP en partículas emitidas por la combustión de diesel y de biodiesel	63
5	Resultados y discusión	64
5.1	Evaluación de las variables de operación	64
5.1.1.	Evaluación del número de extracciones	64
5.1.2.	Evaluación del efecto de la temperatura	64
5.1.3.	Técnica de reducción	65
5.1.4	Sistema abierto y cerrado	66
5.2	Análisis cualitativo	67
5.3	Análisis cuantitativo	73
5.4	Intervalo lineal de trabajo y precisión	74
5.5	Homocedasticidad	78
5.6	Regresión lineal ponderada	79
5.7	Linealidad	82
5.8	Límites de detección y de cuantificación	85
5.9	Eficiencias determinadas por el método de adiciones patrón	94
5.10	Análisis de partículas emitidas por la combustión de diesel y biodiesel	99
6	Conclusiones	102
7	Recomendaciones	105
8	Referencias	106
9	Apéndices	
	Apéndice A Espectros de masas	114
	Apéndice B. Verificación de la báscula	121
	Apéndice C. Curvas Instrumentales	122
	Apéndice D Curvas de método	124
	Apéndice E. Precisión	126
	Apéndice F. Eficiencias por el método de adiciones patrón	129

Índice de tablas

Tabla	Descripción	Página
I	Contaminantes criterio y sus límites máximos establecidos en la normativa mexicana	5
II	Estructura de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)	8
III	Clasificación de la carcinogenicidad de los HAP en humanos según la IARC	9
IV	Técnicas para la extracción o preparación de la muestra	16
V	Condiciones de operación en el CG-EM	34
VI	Hidrocarburos aromáticos policíclicos empleados en la estandarización del método	40
VII	Hidrocarburos aromáticos policíclicos metilados empleados en la estandarización del método	40
VIII	Hidrocarburos aromáticos policíclicos deuterados utilizados como estándares internos	41
IX	Niveles de la curva de calibración del método analítico	42
X	Masas y concentraciones de las disoluciones "stock" de hidrocarburos aromáticos policíclicos	43
XI	Masas y concentraciones de las disoluciones "stock" de hidrocarburos aromáticos policíclicos metilados	43
XII	Masas y concentraciones de las disoluciones "stock" de hidrocarburos aromáticos policíclicos deuterados	44
XIII	Disoluciones "stock" y disolución madre de HAP en concentraciones altas (DMA)	46
XIV	Disoluciones "stock" y disolución madre de HAP concentraciones bajas (DMB)	47
XV	Disolución madre a concentraciones altas de HAP-deuterados (DMA-d)	48
XVI	Disolución madre a concentraciones bajas de HAP-deuterados (DMB-d)	49
XVII	Disoluciones de trabajo de HAP a concentraciones altas (DTA1 y DTA2)	50
XVIII	Disoluciones de trabajo de HAP a concentraciones bajas (DTB1 y DTB2)	50
XIX	Disoluciones de trabajo y disolución de estándar interno de HAP-deuterados	51
XX	Preparación de las disoluciones de fortificación	52
XXI	Tabla de ANOVA para la regresión	61
XXII	Muestras de partículas emitidas por la combustión de diesel y de biodiesel	63
XXIII	Porcentaje de distribución de HAP recuperados en cada extracción utilizando el sistema cerrado	64
XXIV	iones (m/z), tiempos de retención absolutos y relativos de los HAP	72
XXV	Curva de calibración instrumental del fenantreno	73
XXVI	Curva de calibración instrumental del acenaftileno	74
XXVII	Concentraciones relativas, áreas relativas, factores de respuesta relativos y coeficientes de variación por nivel y entre niveles de la curva instrumental del fenantreno	75

Tabla	Descripción	Página
XXVIII	Concentraciones relativas, áreas relativas, factores de respuesta relativos y coeficientes de variación por nivel y entre niveles de la curva de método del fenantreno	76
XXIX	Intervalos lineales para las curvas de método e instrumentales	77
XXX	Concentraciones relativas, áreas relativas y varianzas por nivel de la curva instrumental del fenantreno	78
XXXI	F de Fisher calculada para evaluar homocedasticidad	79
XXXII	Cálculo de los parámetros de la curva instrumental ponderada del fenantreno	80
XXXIII	Cálculo de la desviación de la regresión $S_{(y/x)w}$ de la curva instrumental del fenantreno	81
XXXIV	Pendientes b_w , ordenadas al origen a_w y desviaciones estándar $S_{(y/x)w}$ de las curvas instrumentales y de método de los HAP y sus derivados metilados	81
XXXV	Cálculo del coeficiente de correlación r de la curva instrumental del fenantreno	82
XXXVI	Coefficientes de correlación r evaluados con el estadístico t y coeficientes de determinación r^2 .	83
XXXVII	$F_{calculadas}$ para el análisis de varianza	85
XXXVIII	Límites de detección y de cuantificación instrumentales y de método	86
XXXIX	Comparación de pendientes usando t de <i>Student</i> al 95% de confianza	88
XL	F de Fisher calculada para la comparación de las varianzas $S_{(y/x)w}$ ponderadas	89
XLI	Recuperaciones del fenantreno en todo el intervalo de calibración	94
XLII	% Recuperación en función de la masa de HAP.	96
XLIII	% Recuperación independiente de la masa de HAP	97
XLIV	Masa de HAP [ng] en los extractos orgánicos de las partículas emitidas por la combustión de biodiesel a diferentes regímenes de motor	99
XLV	Masa de HAP [ng] en los extractos orgánicos de las partículas emitidas por la combustión de diesel a diferentes regímenes de motor	100

Índice de figuras

Figura	Descripción	Página
1	Relación entre el tiempo de análisis y los beneficios ambientales.	18
2	Equipo de extracción Soxhlet	19
3	Sistema Kuderna-Danish	19
4	Extractor EFS Hewlett Packard modelo 7680T	21
5	Extractor EFP marca Dionex modelo 350	23
6	Equipo de extracción por microondas MARSXpress (CEM Corporation)	25
7	CEMAUF-SR sin chaqueta protectora con muestra	32
8	Extracción usando la celda en el sistema cerrado CEMAUF-SR	32
9	CEMAUF-R con chaqueta protectora acoplada a un condensador (sistema abierto)	33
10	Secuencia de pruebas preliminares	35
11	CEMAUF-SR. Extracción de la muestra utilizando el sistema cerrado	36
12	Esquema del procedimiento de extracción utilizando la técnica de evaporación por arrastre de vapor	37
13	Esquema del procedimiento de extracción utilizando la celda acoplada a un condensador	38
14	Parámetros evaluados en la estandarización del método analítico	39
15	Preparación de las disoluciones madre, de trabajo y de fortificación para las curvas de calibración	45
16	Preparación de las disoluciones madre, de trabajo y disolución de estándares internos	48
17	Colecta de partículas $\leq 2.5 \mu\text{m}$ emitidas por la combustión de diesel	53
18	Filtro de fibra de vidrio recubierto con teflón después del muestreo	53
19	Filtro dividido con partículas de la emisión por combustión de diesel	54
20	Celda de extracción con la muestra antes y después de la adición del disolvente	55
21	Condensadores con conectores de juntas esmeriladas	55
22	Celdas acopladas a los condensadores	55
23	Extracción dentro del baño ultrasónico	55
24	Visiprep 24 SUPELCO® modelo 5-7250 conectado a la bomba de vacío	56
25	Filtración	56
26	Volumen total del extracto	56
27	Esquema para la concentración de los extractos	57
28	Viales para la concentración de los analitos	57
29	Varianza total integrada por: la explicada y la no explicada, por la regresión lineal.	60
30	Porcentaje de recuperación a 40 °C y 60 °C	65

Índice de figuras

Figura	Descripción	Página
31	Recuperación de HAP utilizando diferentes técnicas de concentración del extracto	65
32	Recuperación de 16 HAP [900 ng mL ⁻¹] extraídos usando la celda con tapón y acoplada a un condensador	66
33	Espectro de masas del fenantreno	67
34	Espectro de masas del fenantreno- <i>d</i> ₁₀	67
35	Cromatograma de iones totales del 1er nivel de la curva instrumental en barrido "SCAN completo"	68
36	Cromatogramas de iones totales del nivel 5 de la curva instrumental por grupo en "SIM"	68
37	Cromatograma de los iones totales del blanco de método con estándar interno "SIM"	69
38	Cromatograma de iones totales del no fortificado del nivel 5 de la curva de método "SIM"	69
39	Cromatograma de iones totales del fortificado 1 del nivel 5 de la curva de método en "SIM"	69
40	Cromatograma de iones totales del extracto orgánico de las partículas emitidas por la combustión de diesel a 1200 rpm (L7) en "SIM"	70
41	Iones extraídos (178, 188, 192 y 206) del cromatograma de la muestra diesel a 1200 rpm en "SIM"	70
42	Iones extraídos (202, 212 y 216) del cromatograma de la muestra diesel a 1200 rpm en "SIM"	71
43	Iones extraídos (228,240,252 y 264) del cromatograma de la muestra L7 en "SIM"	71
44	Iones extraídos (276, 278 y 288) del cromatograma de la muestra L7 en "SIM"	71
45	Curva de calibración instrumental del fenantreno	73
46	Curva de calibración instrumental del acenaftileno	74
47	Precisión de los F _{rr} de la curva de calibración instrumental del fenantreno	75
48	Precisión de los F _{rr} de la curva de calibración de método del fenantreno	76
49	Imagen de la pantalla del análisis de varianza en "Statistica 8.0"	84
50	Regresiones lineales ponderadas (instrumental y método) del fenantreno y representaciones de sus respectivos límites	90
51	Regresiones lineales ponderadas (instrumental y método) del benzo[a]fluoreno y representaciones de sus respectivos límites	91
52	Regresiones lineales ponderadas (instrumental y método) del pireno y representaciones de sus respectivos límites	92
53	Residuales de las regresiones lineales de las curvas instrumentales y de método del pireno y del fenantreno por nivel	93
54	Productos de los ponderadores y los residuales de las curvas instrumentales y de método del pireno y del fenantreno por nivel	93
55	Recuperación del fenantreno en los nueve niveles de masa analizados	95
56	Comparación de los porcentajes de recuperación de HAP en partículas emitidas por la combustión de diesel entre la CEMAUF y otras técnicas reportadas en la literatura	98
57	Porcentaje de reducción en la emisión de HAP en fase particulada usando biodiesel	101

Resumen

El análisis de muestras ambientales mejora el conocimiento del estado real del entorno. Sin embargo, es una actividad contaminante debido al elevado consumo de energía en métodos de larga duración, el uso de disolventes orgánicos en grandes volúmenes y la inherente producción de residuos peligrosos, por lo que surge la necesidad de implementar técnicas cada vez más “verdes”, eficientes y económicas. El método de referencia para determinar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) EPA TO-13A requiere del uso de 700 mL de disolvente y un periodo de extracción de 18 h por Soxhlet, el procedimiento implementado anteriormente en el laboratorio utiliza 60 mL de disolvente y 1 h de extracción por ultrasonido, mientras que el método propuesto en éste trabajo sólo usa 10 mL de disolvente y 10 min en la extracción.

El objetivo del presente trabajo fue estandarizar y optimizar un método analítico que minimice costos y sea ambientalmente amigable para la determinación de HAP en partículas emitidas por la combustión de diesel y biodiesel utilizando una celda de extracción a microescala asistida por ultrasonido diseñada en el laboratorio en proceso de patente No. MX/a/2012/000790

Se evaluaron 4 variables experimentales para el procedimiento de extracción de las muestras: número de extracciones, temperatura y técnica de evaporación y celda sin y con condensador. Para ello se emplearon filtros de teflón con partículas atmosféricas $\leq 2.5 \mu\text{m}$ fortificadas con HAP. Los mejores resultados fueron a 60°C , 5 min (2 veces) de sonicación con la celda conectada a un condensador. El exceso de disolvente se eliminó con flujo suave de nitrógeno gaseoso empleando un sistema con múltiples deflexiones y en proceso de patente No. MX/a/2012/000791. Basados en valores reportados en la literatura de HAP en partículas emitidas por la combustión de diesel y en los análisis preliminares desarrollados en el laboratorio, se determinaron 2 intervalos de calibración, el primero a concentraciones bajas de 5 a 105 ng agrupando a los HAP de alto peso molecular ($216 - 278 \text{ g mol}^{-1}$) incluyendo al acenaftileno y acenafteno y el segundo intervalo a concentraciones altas de 5 – 1000 ng para los HAP de bajo peso molecular ($128 - 202 \text{ g mol}^{-1}$).

Para la estandarización del método se realizó una curva instrumental y otra de método por compuesto, la última se llevó a cabo extrayendo $\frac{1}{4}$ de filtro asumiendo 5 mg de partículas emitidas por un motor a diesel, a las que previamente se les retiró la materia orgánica y posteriormente se enriquecieron con 9 diferentes concentraciones de HAP. Las muestras se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Cada HAP fue identificado por su tiempo de retención relativo y su espectro de masas.

La precisión del método evaluada mediante el coeficiente de variación de los factores de respuesta relativos a un mismo nivel de concentración osciló entre el 1.3 % (benzo[e]pireno a 24.7 ng) y 18.5 % (dibenzo[a,c]antraceno a 100.8 ng) mientras que la precisión en todo el intervalo de calibración calculada con los coeficientes de variación entre todos los niveles osciló entre 6.4 % (benzo[e]pireno) y 19.5 % (dibenzo[a,c]antraceno).

En el intervalo de calibración no se observó homocedasticidad en las varianzas, lo que sugirió el uso de una regresión lineal ponderada. Se calcularon las pendientes, ordenadas y las desviaciones de los modelos de regresión correspondientes a las curvas de método e instrumentales.

La linealidad se evaluó mediante el coeficiente de determinación r^2 cuyos valores fueron superiores a 0.920 ($p < 0.05$, para todos los r). Además se realizó el análisis de varianza para todas las regresiones lineales, mediante el cual se rechazando en todos los casos la hipótesis nula “el modelo no es lineal” con un 99 % de confianza.

Se calcularon los límites de detección (LDI) y de cuantificación (LCI) de las curvas de calibración instrumentales y de método (LDM y LCM respectivamente). Los LDM oscilaron entre 0.3 ng (benzo[*ghi*]perileno) y 114.6 ng (9,10-dimetilantraceno) y los LCM entre 1.0 ng (benzo[*ghi*]perileno) y 382.0 ng (9,10-dimetilantraceno), se observó que fueron determinados en mayor medida por el valor de la desviación de la regresión correspondiente. En general, las curvas de calibración instrumentales presentaron mayores desviaciones de la regresión respecto a las de método, por lo que los límites de detección y cuantificación instrumentales fueron numéricamente superiores (excepto para 5 HAP). Este comportamiento fue independiente del peso molecular del HAP, del intervalo lineal de trabajo y del valor de las pendientes ponderadas. Se observó que el factor más influyente en el cálculo de las desviaciones de la regresión fue la heterocedasticidad contemplada en el ponderador. En este estudio el valor del estadístico $S_{(y/x)w}$ no fue directamente proporcional a la variación entre réplicas de cada nivel, por lo que en futuros estudios se deberá re-evaluar los límites mediante otras pruebas.

Se determinaron los intervalos para cada HAP donde el porcentaje de recuperación depende de la masa adicionada (5 – 180 ng), así como las ecuaciones de las rectas que describen dicha relación. Para los intervalos de masa donde la eficiencia fue constante (350 – 900 ng) se asignó el valor promedio de los porcentajes de recuperación como la eficiencia correspondiente a dichos niveles de adición. Para los intervalos de masa donde la eficiencia es constante > 350 ng, se asignó el valor promedio de los porcentajes de recuperación como la eficiencia correspondiente a dichos niveles de adición. Los valores promedio del porcentaje de recuperación incluyendo todos los niveles de adición oscilaron entre el 69.2 ± 8.9 % (Tripticeno) y el 106.7 ± 17.2 % (7,12-dimetilbenzo[*a*]antraceno), valores que se encuentran dentro de los límites de aceptación marcados por el método de referencia EPA TO13-A (60 – 120 %).

Finalmente para la aplicación de éste método se analizaron filtros con partículas emitidas por un camión utilizando diesel y una mezcla de éste al 10% con biodiesel B10 a cuatro diferentes revoluciones por minuto (rpm) del motor y sin torque. La cantidad de HAP mínima cuantificada en las muestras fue de 3.0 ng de perileno (LCM = 2.5) en la muestra de la emisión de diesel a 1200 rpm y la cantidad máxima cuantificada dentro del rango de trabajo fue de 910.0 ng de Fenantreno (LCM = 87.5 ng)

El método propuesto para la extracción es adecuado debido a que cumple en términos de eficiencia, precisión, linealidad (r^2), límites de detección y cuantificación adecuados para el análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos en partículas emitidas por la combustión de un motor de diesel y biodiesel, siendo su uso una alternativa ambientalmente amigable y económica, debido al uso menor volumen de disolvente, minimización de residuos y reducción en el tiempo de análisis, lo que repercutirá en la mejora de la relación costo-beneficio.

1. Introducción

El estudio de la contaminación atmosférica es una tarea compleja y exige la participación multidisciplinaria de profesionistas dedicados a la caracterización química de los contaminantes, su dispersión atmosférica, sus fuentes, sus receptores, sus efectos en salud humana, en los ecosistemas, en el clima y en los materiales.

El análisis químico ambiental es una herramienta que conduce a un mejor conocimiento del estado real del ambiente, así como a la comprensión de los diferentes procesos que suceden dentro del mismo. La optimización de las técnicas analíticas permite alcanzar mayor sensibilidad para determinar cantidades cada vez más pequeñas de los contaminantes, evitar fluctuaciones en las concentraciones dependientes del tiempo debido a la posible degradación de los analitos, al manejo y al lugar de toma de la muestra, e identificar interferencias debidas a la naturaleza de la matriz o a la presencia de compuestos con estructuras o propiedades físico-químicas parecidas a los analitos de interés. De esta forma, el objetivo primordial de cualquier análisis es conocer cualitativamente y/o cuantitativamente las especies químicas que se encuentran presentes en la matriz a estudiar con la mayor exactitud y precisión, de manera confiable y con la menor incertidumbre asociada a las mediciones.

2. Marco teórico

2.1 Contaminación atmosférica

Restringiendo la definición dada por la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA) 3-VI, VII al área que le concierne a éste estudio, la contaminación atmosférica es la presencia de toda materia o energía en cualquiera de sus estados físicos y formas que al incorporarse o actuar en la atmósfera modifican su composición y condición natural, causando desequilibrio ecológico.

Dependiendo de su área de impacto la contaminación del aire puede ser (Manahan 2007):

- **Intramuros:** provocada principalmente por las cocinas carentes de una ventilación adecuada y por el humo del cigarro.
- **Local:** provocada por las emisiones a la atmósfera en una zona determinada de la ciudad, ya sea de tipo industrial, por incendios de basureros, llantas, fogatas, vehículos, etc.
- **Regional:** ocurre en una escala de varios kilómetros cuadrados, por ejemplo, la generada por el neblumo presente en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.
- **Global:** aquella cuyas consecuencias afectan a todo el planeta como el provocado por el aumento de los gases de efecto invernadero y la destrucción en la capa de ozono en la estratósfera.

Los contaminantes **primarios** son aquellos directamente emitidos por las fuentes, algunos ejemplos son: dióxido de azufre (SO_2), dióxido de carbono (CO_2), hidrocarburos volátiles, monóxido de carbono (CO), o partículas suspendidas atmosféricas, ya sea de origen antropogénico o biogénico, mientras que los **secundarios** son el resultado de procesos químicos y físicos que se llevan a cabo sobre los contaminantes primarios atmosféricos, ejemplos de éstos son el ácido sulfúrico (H_2SO_4) resultante de la oxidación del SO_2 , el NO_2 que se genera a partir de NO , así como el ozono en la tropósfera que se produce por medio de procesos fotoquímicos en presencia de hidrocarburos u otros compuestos de carbono y óxidos de nitrógeno. Entre los contaminantes secundarios también se encuentran las partículas generadas por reacciones químicas atmosféricas sobre contaminantes primarios (Manahan 2007).

En México existen normas que establecen los límites máximos para los denominados **contaminantes criterio**, éstos se emplean para calificar la calidad del aire y fueron seleccionados debido a sus efectos nocivos sobre la salud de la población, del ambiente y de los materiales. Entre ellos, las partículas atmosféricas han sido constantemente reevaluadas considerando cada vez menor diámetro, primero se establecieron los niveles permitidos para partículas suspendidas totales (PST), después para aquéllas con diámetro menor o igual a $10 \mu\text{m}$ (PM_{10}) y la última actualización fue la regulación para partículas con diámetro menor o igual a $2.5 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$) (NOM-025-SSA1-1993).

Tabla I. Contaminantes criterio y sus límites máximos establecidos en la normatividad mexicana.

Contaminante Criterio	Norma Oficial	Límite Máximo
Dióxido de azufre, SO₂	NOM-022-SSA1-1993	0.13 ppm = 341 $\mu\text{g m}^{-3}$ en 24 h una vez al año 0.03 ppm = 79 $\mu\text{g m}^{-3}$ como media aritmética anual
Dióxido de nitrógeno, NO₂	NOM-023-SSA1-1993	0.21 ppm = 395 $\mu\text{g m}^{-3}$ en 1h, una vez al año
Plomo, Pb	NOM-026-SSA1-1993	1.5 $\mu\text{g m}^{-3}$ en un periodo de 3 meses promedio aritmético
Monóxido de carbono, CO	NOM-021-SSA1-1993	11.0 ppm = 12,595 $\mu\text{g m}^{-3}$ en promedio móvil de 8 h una vez al año
Ozono, O₃	NOM-020-SSA1-1993	0.11 ppm = 216 $\mu\text{g m}^{-3}$ promedio horario, para no ser rebasado más de una vez al año
Material Particulado	NOM-025-SSA1-1993	Valores normados para 24 h al percentil 98: <ul style="list-style-type: none"> • PST \leq 210 $\mu\text{g m}^{-3}$ • PM₁₀ \leq 120 $\mu\text{g m}^{-3}$ • PM_{2,5} \leq 65 $\mu\text{g m}^{-3}$ Valores normados del promedio anual: <ul style="list-style-type: none"> • PM₁₀ \leq 50 $\mu\text{g m}^{-3}$ • PM_{2,5} \leq 15 $\mu\text{g m}^{-3}$

2.1.1 Partículas suspendidas atmosféricas

Constituyen la forma más visible de la contaminación atmosférica, los aerosoles atmosféricos están constituidos por gases y partículas sólidas y líquidas con diámetro entre 0.001 y 100 μm . Las partículas más grandes se verán afectadas por la fuerza de gravedad y de inercia, mientras que las de menor tamaño presentarán movimientos Brownianos suspendidas en la fase gas. Una de las propiedades físicas más relevantes es el *diámetro aerodinámico*, que se define como el diámetro de una esfera de densidad unitaria (1000 kg m^{-3}) con la misma velocidad de sedimentación por gravedad que la partícula medida. El diámetro aerodinámico es útil al estudiar la velocidad de sedimentación, el transporte y el comportamiento inercial de las partículas en el tracto respiratorio y en los dispositivos implementados para el control de sus emisiones (Baron y Willeke 2001).

Las partículas pueden clasificarse según su diámetro aerodinámico en:

- Partículas suspendidas totales (PST) con diámetro aerodinámico menor a 40 μm .
- PM_{10} con diámetro aerodinámico menor o igual a 10 μm , llamadas partículas gruesas.
- $\text{PM}_{2.5}$ con diámetro aerodinámico menor o igual a 2.5 μm , conocidas como partículas finas.

Los principales efectos de las partículas sobre el ambiente son:

- La dispersión y absorción de la radiación solar, ocasionando cambios en la temperatura de la atmósfera (Baron y Willeke 2001).
- La alteración de la composición microfísica de las nubes debido a su capacidad de actuar como núcleos de condensación (Reid y Slayer 2002).
- Proporcionan superficies en la que se llevan a cabo reacciones químicas atmosféricas (Grassian 2001).
- Pueden actuar como portadores de contaminantes desde la atmósfera hacia las superficies, ya sea en cuerpos de agua, plantas o alimentos (Cousins y Mackay 2001).

La depositación de las partículas sobre las superficies vegetales depende en mayor medida de la distribución de su tamaño y en menor contribución de su composición química. La cubierta de polvo sobre la vegetación puede causar abrasión y calentamiento, además de la reducción del flujo de fotones disponibles para llevar a cabo la fotosíntesis. Materiales alcalinos o ácidos provocan daño en el tejido de las hojas. Cuando las partículas se depositan en el suelo entran en las rutas metabólicas influyendo en los ciclos biogeoquímicos, especialmente en el del nitrógeno, causando cambios en el pH y consecuentemente la biodisponibilidad de cationes alcalinos y de aluminio (Grantz *et al.* 2003).

Adicionalmente a los efectos dentro del ecosistema, las partículas provenientes de las zonas urbanas con compuestos orgánicos semivolátiles, pueden depositarse sobre cultivos o centros de distribución de alimentos cercanos a las ciudades, sumando al riesgo de la población por su inhalación el de la exposición por su ingesta (Lobscheid *et al.* 2004).

Las PM_{2.5} poseen mayor impacto en la salud, debido a que su tamaño les permite llegar hasta la última estructura anatómica de nuestro sistema respiratorio, los alveolos, donde su eliminación se dificulta, mientras que las partículas con diámetro entre 2.5 µm y 10 µm sólo llegan a penetrar hasta la laringe (Hunt *et al.* 2003). Las partículas inhaladas se depositan en los pulmones causando inflamación y si la exposición es crónica puede causar daño a los tejidos (Seaton *et al.* 1995). Los síntomas de afectación en el sistema cardiovascular aparecen en un periodo breve posterior a la exposición, esto se explica debido a que las partículas ultrafinas logran transferirse desde el sistema respiratorio al circulatorio, provocando daño directo (Godleski *et al.* 2000). Diversos estudios han identificado a las partículas suspendidas atmosféricas de todos los diámetros aerodinámicos como un factor relevante de riesgo para el desarrollo y exacerbación de enfermedades cardiovasculares, aunque algunos atribuyen a las partículas de menor tamaño la mayor toxicidad. También se ha observado que la incidencia de enfermedades cardiovasculares asociadas a la contaminación del aire es ligeramente mayor en las mujeres que en los hombres (Polichetti *et al.* 2009)

2.2 Compuestos Aromáticos Policíclicos

Los Compuestos Aromáticos Policíclicos (CAP) son una familia de hidrocarburos formados por dos o más anillos aromáticos fusionados. Estos pueden estar sustituidos o contener un átomo diferente al carbono en el anillo aromático. Dependiendo de su estructura se pueden clasificar en:

- Compuestos poliaromáticos homocíclicos.
- Compuestos aromáticos policíclicos sustituidos.
- Compuestos poliaromáticos heterocíclicos.

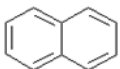

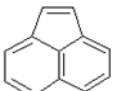
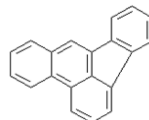

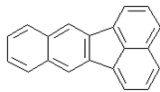
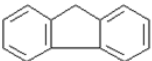
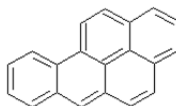
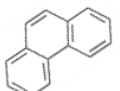
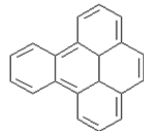
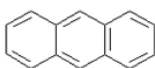
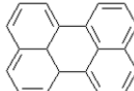
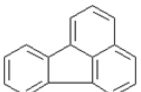
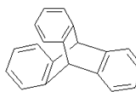
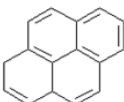
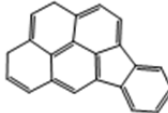
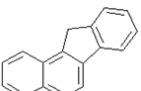
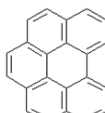
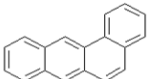
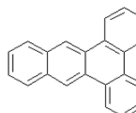
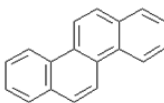
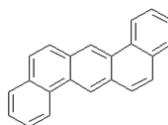
Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son compuestos poco solubles en agua y altamente lipofílicos, presentan alta solubilidad en disolventes orgánicos como tolueno, metanol, acetona, cloruro de metileno y tetrahidrofurano. La mayoría de los HAP con presión de vapor baja están presentes en las partículas. En presencia de radiación ultravioleta pueden sufrir foto-descomposición.

En el ambiente se les puede encontrar tanto en agua, suelo y aire. En la atmósfera, estos compuestos orgánicos pueden reaccionar con otros contaminantes como el

ozono, los óxidos de nitrógeno y el dióxido de azufre, produciendo dionas, nitro- y dinitro-HAP y ácidos sulfónicos, respectivamente (WHO 2000).

Su formación se debe principalmente a procesos de pirólisis y pirosíntesis por la combustión incompleta de materiales orgánicos durante actividades industriales como la quema de gas natural, carbón, petróleo crudo, gasolina, diesel, madera y tabaco (WHO 2000).

Tabla II. Estructura de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).

Nombre	Estructura	PM	Nombre	Estructura	PM
Naftaleno		128.17	Trifenileno		228.23
Acenaftileno		152.19	Benzo[b]fluoranteno		252.31
Acenafteno		154.20	Benzo[k]fluoranteno		252.31
Fluoreno		166.21	Benzo[a]pireno		252.31
Fenantreno		178.23	Benzo[e]pireno		252.31
Antraceno		178.23	Perileno		252.31
Fluoranteno		202.25	Tripticeno		254.33
Pireno		202.25	Indeno[1,2,3-cd]pireno		276.33
Benzo[a]fluoreno		216.28	Benzo[ghi]perileno		276.33
Benzo[a]antraceno		228.23	Dibenzo[a,c]antraceno		278.35
Criseno		228.23	Dibenzo[a,h]antraceno		278.35

*PM = Peso molecular

La IARC (2012) (*International Agency for Research on Cancer*) ha clasificado a los HAP según su carcinogenicidad en humanos (tabla III).

Tabla III. Clasificación de la carcinogenicidad de los HAP en humanos según la IARC.

Clasificación	Compuesto
No clasificable como carcinogénico	Acenafteno
	Fluoreno
	Fenantreno
	Antraceno
	Fluoranteno
	Pireno
	Benzo[a]fluoreno
	Trifenileno
	Benzo[e]pireno
	Perileno
	Benzo[ghi]perileno
Probablemente carcinogénico	Dibenzo[a,h]antraceno
Posiblemente carcinogénico	Naftaleno
	Benzo[a]antraceno
	Criseno
	Benzo[b]fluoranteno
	Benzo[k]fluoranteno
	Indeno[1,2,3-cd]pireno
	Dibenzo[a,c]antraceno
Carcinogénico	Benzo[a]pireno

Algunos mecanismos mediante los que esta familia tiene efectos mutagénicos son la formación de aductos y efectos oxidativos en ADN, así como los polimorfismos en enzimas encargadas de la reparación del mismo (IARC 2010). Los HAP en el material particulado han demostrado ser mutagénicos (Villalobos-Pietrini *et al.* 2007). También existen estudios acerca de su toxico-cinética a través del análisis de sus metabolitos en semen y en orina de individuos expuestos a sus fuentes (Xia *et al.* 2009).

2.3 Combustibles

Los sistemas energéticos en la mayoría de las economías dependen de la quema de combustibles fósiles (IPCC 2006) como el gas natural y los derivados del petróleo: petróleo diáfano, diesel, combustóleo, gasóleo, gas L.P., butano, propano, metano, isobutano, propileno, butileno o cualquiera de sus combinaciones (NOM-086-SEMARNAT-SENER-SCFI-2005).

En la actualidad, la energía mundial se produce y consume a un ritmo que no puede sostenerse (Kamil y Ahmet 2003). La escasez de los combustibles convencionales, el incremento en su costo y la abundancia de los contaminantes generados por su combustión tal como: óxidos de nitrógeno, óxidos de azufre, plomo e hidrocarburos (IPCC 2006) requiere regulación de las emisiones atmosféricas, eficiencia en la producción, transmisión y distribución de la energía así como el desarrollo de fuentes de energía renovables más atractivas (Kamil y Ahmet 2003).

2.3.1 Diesel

El primer proceso en la refinación del petróleo es una destilación, en la que se separa el petróleo en fracciones. La fracción media resultante de esta destilación contiene a las quirosinas y a la fracción diesel, se caracteriza porque el punto de ebullición de sus componentes se encuentra en el intervalo de 200 a 350 °C; el diesel también se manufactura a través de mezclas de gasóleos con querosina (Leyva y Rodriguez 1999).

Se consume principalmente en máquinas de combustión interna de alto aprovechamiento de energía; su uso se orienta comúnmente como energético en el parque vehicular. De acuerdo con Lozada *et al.* (2010), de la flota vehicular nacional que usa diesel como combustible el 97 % corresponde a camiones de carga (de los que el 78 % tiene 10 años en uso) y el 2 % a camiones de pasajeros, además se espera que la venta anual de ambos tipos de vehículos crezca en un 4 % en el periodo del 2008 al 2031. En este estudio también se estima que para el 2015 el transporte a diesel utilizará aproximadamente el 34 % del combustible requerido en el sector transporte del país.

Características (Leyva y Rodriguez 1999):

- *Índice de cetano*. Mide la calidad de ignición del diesel y depende de la relación entre el n-hexadecano y heptametilnonano. Es una medida de la tendencia del diesel a “cascabelear” en el motor, a diferencia de la gasolina, en el diesel la

propiedad deseable es la autoignición. Los motores están diseñados para un índice de cetano entre 40 y 55, aumenta conforme se incrementa el largo de la cadena de los gasóleos, mientras que los compuestos aromáticos y los alcoholes disminuyen su valor. La adición de aditivos en un 0.5 % mejora el índice de cetano en 10 unidades, dichos aditivos están compuestos de alquilnitratos, amilnitratos primarios, nitritos y peróxidos, debido a su composición tienden a aumentar las emisiones de NO_x . El diesel de PEMEX tienen un índice de cetano de 52 a 55.

- *Azufre.* Desde 1993 México se unió a la tendencia mundial de reducir el contenido de azufre a 0.05 % en el diesel, debido a su efecto en la emisión de partículas y SO_2 .
- *Compuestos aromáticos.* El contenido de aromáticos afecta la combustión y la temperatura de la flama, como consecuencia tiene un efecto sobre la emisión de HAP, partículas y NO_x . El diesel de PEMEX contiene 30 % de estos compuestos.
- *Lubricidad.* Las bombas de inyección del diesel no poseen un sistema de lubricación externo por lo que dependen de las propiedades del mismo combustible. Los componentes del diesel que actúan como lubricantes son los hidrocarburos más pesados y las sustancias polares, estos compuestos son parcialmente removidos en los procesos necesarios para disminuir el contenido de azufre, por lo que un diesel bajo en azufre corre el riesgo de poseer menos lubricidad.

En México, el diesel producido en las refinerías de PEMEX cumple estándares de calidad nacionales e internacionales.

2.3.2 Biodiesel

El biodiesel se refiere a una forma equivalente de diesel procesado a partir de fuentes biogénicas, es una alternativa de combustible para los motores de combustión interna. Se define como una mezcla de ésteres mono alquílicos de ácidos grasos de cadena larga (aproximadamente con longitud de cadena de C_{14} - C_{22}) derivados de aceites vegetales, grasas animales o residuos de aceite de cocina y se obtiene a través de una reacción de transesterificación. El término biodiesel se atribuye al derivado 100 % de aceites vegetales o grasas animales, mientras que, el término petrodiesel es para las mezclas de diesel y biodiesel conocidas como B XX, donde XX se refiere a las

proporciones de la mezcla en términos de volumen, siendo B20 la más común (Monteiro *et al.* 2008).

Algunas ventajas del biodiesel son: ambientalmente amigable en comparación con el petróleo y el diesel, de fácil disponibilidad, relativamente alta eficiencia en la combustión, bajo contenido de azufre y compuestos aromáticos; además los riesgos asociados con el manejo, transporte y almacenamiento son menores comparados con otros combustibles.

Desde el punto de vista económico promueven el campo y crean empleos tanto en la agricultura como en la industria de producción de biodiesel (SEMARNAT-INE-UNAM-CIECO 2008).

El principal motivo para no usar los aceites puros de origen animal o vegetal como combustible es su alta viscosidad, la cual impide completa atomización en la cámara de combustión, que sumado a la formación de depósitos a bajas temperaturas causan problemas de operación en la máquina. La transesterificación de las grasas y/o aceites usados como materia prima reduce la viscosidad hasta valores parecidos a los del diesel permitiendo su uso como combustible en las máquinas sin cambios en el diseño. Las condiciones típicas de reacción usando metanol y materiales que contienen triacilglicérols son: relación molar metanol:aceite vegetal de 6:1, temperatura de 60 a 65 °C durante una hora y presión atmosférica en presencia de hidróxido o preferentemente de algún catalizador alcóxido. La presencia de ácidos grasos y agua en la reacción deben evitarse y es preferible usar aceite vegetal refinado a usar el extracto crudo. El uso de enzimas catalizadoras en la producción también reduce etapas de pretratamiento de la materia prima, permiten versatilidad en el alcohol usado y producen glicerol de una mayor calidad pero elevan el costo de producción (Knothe 2010).

Aunque se compone mayormente de ésteres de ácidos grasos también contiene intermediarios de la reacción como monoacilglicérols, diacilglicérols, residuos de triacilglicérols, glicerol y metanol, ácidos grasos libres e impurezas del aceite vegetal como glucósidos esterificados, la cantidad presente de estos componentes está limitada por los estándares ASTM D6751 correspondiente a los Estados Unidos de Norteamérica y el EN 14214 correspondiente a la Unión Europea. El índice de cetano en el biodiesel depende del largo de la cadena de los ésteres y su grado de insaturación, los ésteres poli-insaturados son la causa de problemas de estabilidad

oxidativa, mientras que los ésteres saturados son la causa de los problemas de flujo del combustible a bajas temperaturas (Knothe 2010).

En México, aún no se tiene una norma que establezca las especificaciones que debería cumplir el biodiesel para su consumo (SENER 2010).

2.4 Química Verde

La afectación de nuestro ambiente por actividades antropogénicas ha tratado de abatirse desde diferentes áreas; la química no es la excepción y ante la responsabilidad de prevenir y disminuir el impacto sobre el ambiente adoptando acciones encaminadas al aprovechamiento sustentable de nuestros recursos surge a finales del siglo XX el concepto de Química Verde.

Durante la segunda mitad de la década de los ochenta, en Europa y en los Estados Unidos se discutía la necesidad de considerar el efecto ecológico negativo de las actividades químicas, incluyendo ambas ramas la producción en escala industrial y el desarrollo a nivel laboratorio (Armenta *et al.* 2008).

El primer antecedente del término “química verde” corresponde a su uso por Anastas en 1991, en la presentación de un programa de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (*Environmental Protection Agency, EPA*) con el objetivo de impulsar nuevas tecnologías y prácticas químicas ambientalmente amigables. Desde entonces, alrededor del mundo se han establecido foros, premios y publicaciones enfocadas a incentivar dichas prácticas (Wardencki *et al.* 2005).

El concepto de química verde puede definirse como el uso de técnicas o metodologías químicas que reducen o eliminan el uso de materias primas, productos, subproductos, disolventes, reactivos, etc, que son peligrosos para el humano y el ambiente (Anastas 1999). Estas técnicas o metodologías a utilizar deberán sustentarse en doce principios (Wardencki *et al.* 2005):

- 1) Prevención: es mejor prevenir la generación de residuos que tratarlos después de haber sido generados.**
- 2) *Economía atómica:* los métodos deben ser diseñados para incorporar todos los componentes iniciales al producto final.

- 3) *Síntesis de químicos menos tóxicos*: siempre que sea posible, los métodos de síntesis deberán usar y generar sustancias que posean poca o ninguna toxicidad al humano o al ambiente.
- 4) *Diseño de productos químicos más seguros*: los productos químicos deben ser diseñados de manera que al mismo tiempo que cumplan con su función minimicen su toxicidad.
- 5) ***Disolventes y sustancias auxiliares más seguros***: se debe reducir el uso de disolventes y reactivos además de preferir el uso de sustancias y disolventes inocuos.
- 6) ***Diseño energéticamente eficiente***: los requerimientos de energía deben ser ubicados y ésta debe ser utilizada eficientemente. Se preferirán métodos llevados a cabo a temperatura ambiente y presión atmosférica.
- 7) ***Uso de insumos renovables***: siempre que sea económica y técnicamente posible, se preferirá el uso de insumos o materias primas renovables sobre aquellas que no lo son.
- 8) *Reducción de derivados*: el uso innecesario de derivados químicos de manera temporal, como lo son: el bloqueo, la protección y la desprotección de grupos funcionales debe evitarse debido a que estos procesos requieren insumos y energía adicionales.
- 9) *Catálisis*: el uso de reactivos en cantidades catalíticas se deben preferir sobre aquellos utilizados en cantidades estequiométricas.
- 10) *Degradación*: las sustancias químicas deben ser diseñadas para que una vez cumplida su función se integren al ambiente de manera inocua.
- 11) ***Análisis en tiempo real para prevenir la contaminación***: las metodologías analíticas deben mejorarse para monitorear en tiempo real los procesos químicos y evitar la formación de sustancias peligrosas.

- 12) Química más segura para la prevención de accidentes: los reactivos necesarios, así como los productos deben seleccionarse con el fin de minimizar el riesgo de accidentes como: fugas, derrames, explosiones o incendios y su consecuente impacto al ambiente.**

2.4.1 Química analítica verde

La química analítica puede adoptar prácticas o medidas para realizar sus funciones de manera ambientalmente amigable. El número de publicaciones relacionadas con éste tema se ha incrementado de manera exponencial desde la década de los noventa, en los últimos 5 años, el aumento de referencias ha sido aún mayor (Armenta *et al.* 2008).

Puede parecer contradictorio pero el análisis ambiental es una actividad que resulta ser contaminante debido a diferentes causas: el consumo elevado de energía en métodos de larga duración y el uso no racionado de disolventes orgánicos con la inherente producción de residuos peligrosos.

Para evitar lo anterior y de manera paralela al desarrollo de la química verde, en lo particular la química analítica ha dado prioridad a 4 de los doce principios mencionados para encaminar las acciones a llevar a cabo en el laboratorio (Namieśnik 2001).

- Eliminación en el consumo de reactivos, especialmente de disolventes orgánicos.
- Reducción de vapores o gases, así como, de residuos sólidos y líquidos en el laboratorio.
- Eliminación de reactivos que posean alta toxicidad o ecotoxicidad.
- Reducción de tareas laboriosas y consumo de energía.

Las acciones que se pueden realizar en el laboratorio para aplicar estos principios en nuevas metodologías son las siguientes (Namieśnik 2001).

- El uso de técnicas directas que permitan el análisis de la muestra sin la necesidad de un tratamiento o preparación previa, al igual que aquellas que establezcan tiempos cortos en dicho tratamiento.
-

- Reducción de la cantidad de muestra mediante el uso de métodos a escala más pequeña.
- La realización de los análisis de manera directa en el sitio de interés.
- Aplicación de las llamadas técnicas alternativas en la preparación de la muestra, es decir, aquéllas que usan menor cantidad de disolventes e inocuos al ambiente y el uso de técnicas asistidas.
- Uso de sellos y/o tapones que eviten la emisión de vapores orgánicos o gases.
- La determinación simultánea de varios compuestos en un solo ciclo de análisis.
- Automatización y robotización de las operaciones de laboratorio.

El análisis químico puede dividirse de manera general en 4 etapas: toma de muestra, tratamiento de la muestra, análisis instrumental y evaluación de los resultados (Tobiszewski *et al.* 2009). La preparación de la muestra suele ser la etapa más contaminante, debido a esto, se ha incorporado el uso de diferentes técnicas. La tabla IV describe las técnicas de extracción según su principio.

Tabla IV. Técnicas para la extracción o preparación de la muestra. Modificado de Tobisewski *et al.* (2009).

Principio	Técnica
Uso de disolventes menos tóxicos	Extracción con fluidos supercríticos Líquidos iónicos Extracción con gases Extracción usando surfactantes (<i>Cloud-point</i>)
Uso de menor volumen de disolvente	Extracción en fase sólida Micro-extracción en fase sólida Micro-extracción en fase líquida Adsorción sobre una cama de fase estacionaria utilizando como soporte barras de agitación (<i>Stir-bar sorptive extraction</i>) Extracción por gota de disolvente Micro-extracción por gota de disolvente Micro-extracción en fase líquida Técnicas de membrana
Uso de disolvente asistido por diferentes tipos de energía.	Extracción asistida por microondas Extracción asistida por ultrasonido Extracción utilizando fluidos presurizados

El análisis instrumental, por cromatografía tanto de gases (CG) como de líquidos, también ha sido optimizado mediante el diseño de nuevos equipos con nuevas tecnologías más rápidas y versátiles, aunado al desarrollo de técnicas que minimizan el tratamiento de muestra como lo es la cromatografía de gases bidimensional o bien la cromatografía rápida, donde además de reducir los tiempos de análisis, se conserva e incrementa la eficiencia en la separación que ofrece la CG, economizando significativamente el análisis. Ambos conceptos han sido fuertemente impulsados para reducir costos, el consumo de reactivos y de energía, lo que minimiza el impacto negativo al ambiente.

Es importante mencionar que la mayoría de las herramientas se han desarrollado antes que los conceptos de la química verde (Armenta *et al.* 2008), por lo que es una área donde se pueden explotar los avances en la ciencia y en la tecnología para desarrollar metodologías cada vez más limpias y eficientes.

2.5 Química a micro-escala

A principios de la década de los ochenta se comenzó a disminuir la escala en la experimentación química, con fines didácticos en instituciones de nivel medio-superior y superior en los Estados Unidos de Norteamérica, entre 1992 y 1993, se estableció el Centro Nacional de Química a Microescala en ese país. Rápidamente se reconoció como una práctica conveniente en los laboratorios de química a nivel mundial, en México se cuenta con el Centro Mexicano de Química Verde y Microescala de la Universidad Iberoamericana (Ibáñez 2005).

La práctica de la química a micro-escala se enfoca a la reducción del tamaño en el material de vidrio utilizado en el laboratorio y como consecuencia el uso de cantidades más pequeñas de reactivos y disolventes (Singh *et al.* 1999), disminuyendo también el riesgo de accidentes, la exposición a sustancias tóxicas y la generación de residuos peligrosos. En algunas ocasiones el costo o reparación de este tipo de material no es económico, sin embargo se compensa por el ahorro en la disminución de los múltiples insumos anteriormente mencionados. Adicionalmente al beneficio económico por la aplicación de la química a micro-escala, sin duda es una práctica ambientalmente amigable. Puede ser implementada en procedimientos analíticos sin que esto signifique pérdida de los atributos de calidad en el análisis, empleando similarmente materiales

volumétricos de calidad adecuada, materiales de referencia y aplicando buenas prácticas de laboratorio (Baeza *et al.* 2005).

La eficiencia también se incrementa debido a que el microescalamiento permite la reducción en tiempos de operación. La siguiente figura ilustra la clasificación de los análisis de acuerdo al tiempo para su desarrollo y su relación con el impacto ambiental (Tobiszewski *et al.* 2009).

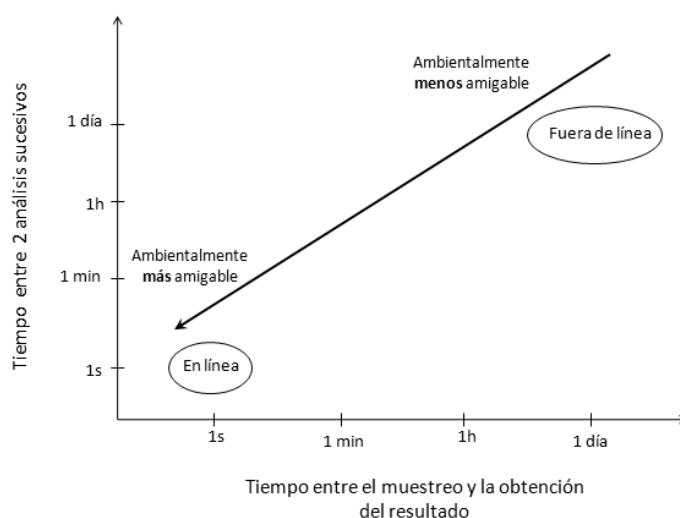


Figura 1. Relación entre el tiempo de análisis y los beneficios ambientales. Modificado de Tobiszewski *et al.*(2009)

2.6 Técnicas de extracción

Previo al análisis instrumental de los compuestos de interés, la mayoría de las veces es necesario aislar a los analitos de la matriz que los contiene, para ello se han implementado (dependiendo de la complejidad de la matriz) diferentes técnicas de extracción, de pre-fraccionamiento y de pre-concentración. A continuación se describen brevemente las técnicas de extracción más comunes para la recuperación de los compuestos orgánicos en matrices sólidas.

2.6.1 Extracción por Soxhlet

En este sistema, la muestra se mezcla con un disolvente orgánico (de acuerdo a la polaridad de los analitos a extraer de la matriz), se coloca en un cartucho o filtro de fibra de vidrio dentro del equipo Soxhlet (figura 2), donde el disolvente se evapora y se

condensa en un ciclo que puede durar varias horas, realizando una serie de extracciones consecutivas en el mismo matraz.

Este método ha sido considerado como referencia desde hace décadas para la extracción de compuestos orgánicos en matrices sólidas e implementado en diversas guías internacionales para el tratamiento de muestras como en suelo (Método EPA 3540 de la serie SW-846) y en partículas suspendidas en el aire (Método EPA TO-13A). Aunque es un procedimiento eficiente, se necesitan grandes cantidades de disolvente, de 100 a 800 mL y de 16 a 24 h de extracción.

Después de la extracción, el extracto se trasvasa al matraz pera del sistema Kuderna-Danish acoplado a un tubo concentrador, después se le coloca la columna Snyder de 3 bolas en la boca superior del matraz y todo el sistema se introduce en un baño a temperatura controlada para reducir el volumen de disolvente (figura 3) y recuperarlo en un matraz independiente, mientras que por otro lado el extracto se contiene en el tubo concentrador.

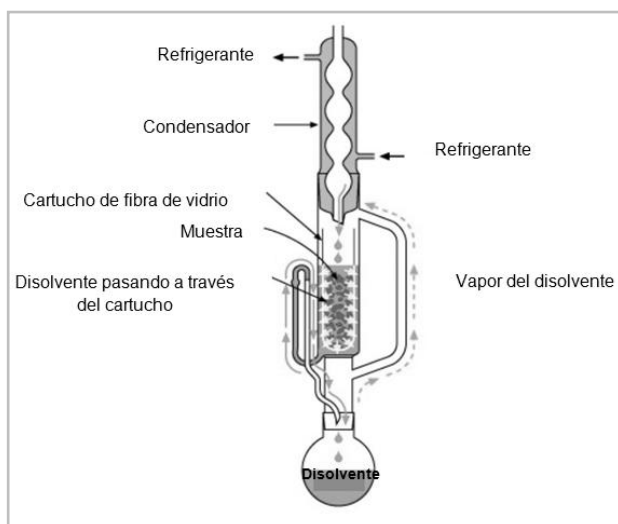


Figura 2. Equipo de extracción Soxhlet

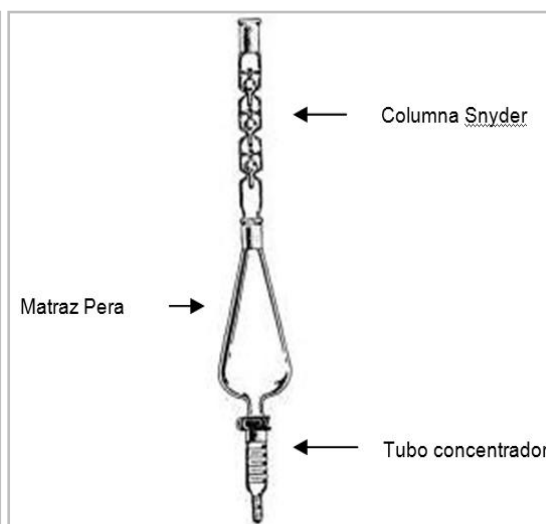


Figura 3. Sistema Kuderna-Danish

Kaupp y McLachlan (2000) usaron este método de extracción para el estudio de la distribución de los HAP en partículas atmosféricas de distinto tamaño, extrayéndolas con tolueno durante 18 h. Vasconcelos *et al.* (2003) reportaron recuperaciones entre 52 % y 120 % en la extracción por Soxhlet durante 20 h con cloruro de metileno de HAP presentes en partículas suspendidas totales (PST). Mannino y Orecchio (2008) en un estudio realizado para correlacionar las concentraciones de HAP en partículas

atmosféricas con las concentraciones de HAP en polvo de interiores obtuvieron eficiencias entre el 75 % y 100 % extrayendo durante 24 h con una mezcla de cloruro de metileno y pentano, Ozcan y Aydin (2009) recuperaron entre $72 \pm 1\%$ y $101 \pm 1\%$ de la masa de HAP con precisión $\leq 8\%$ en la extracción de estos compuestos en PST usando 3 extracciones de 16 h consecutivas, cada una con 25 mL de una mezcla 1:1 (v/v) de n-hexano y éter. Por otra parte, Tsai *et al.* (2010) extrajeron HAP en partículas emitidas por un generador que usaba como combustible mezclas de diesel y de biodiesel utilizando como disolvente una mezcla 1:1 (v/v) de n-hexano y diclorometano durante un periodo de extracción de 24 h.

2.6.2 Extracción por fluidos supercríticos (EFS)

En esta técnica la extracción de los compuestos se lleva a cabo a temperatura y presiones por arriba de su punto crítico. En estas condiciones, los fluidos poseen propiedades tanto de gas como de líquido, la densidad varía dependiendo de las condiciones y en consecuencia se incrementa la penetración en la matriz haciendo la extracción más selectiva y eficiente. A una temperatura dada, el poder del disolvente aumenta conforme incrementa la densidad, modificando las condiciones de temperatura y presión, también es posible manipular el coeficiente de difusión, la constante dieléctrica y la viscosidad para mejorar la extracción de los analitos.

Como disolventes se pueden usar: amoníaco, propano, agua, triclorofluorometano, xenón, hexafloruro de azufre, no obstante, el compuesto más empleado es el dióxido de carbono, ya que es barato, inocuo al ambiente, relativamente no tóxico, prácticamente inerte y se encuentra comercialmente disponible con alta pureza, sin embargo, no es tan específico ya que puede solubilizar gran variedad de compuestos. Aunado al empleo de disolventes amigables con el ambiente, los analitos de interés no se diluyen dado que sólo se necesitan de 10 a 20 mL de disolvente. Las condiciones críticas a las que se lleva a cabo la extracción requieren de mayor energía aplicada al sistema, lo que facilita el rompimiento de las fuerzas que unen al analito con la matriz.

Sus limitaciones se deben a la poca efectividad en la extracción de compuestos polares, así como la dificultad de su uso en muestras naturales, pues existen estudios donde se demuestra que los analitos se encuentran unidos a la matriz con mayor fuerza que lo que reflejan los estudios realizados con matrices fortificadas, también existen casos en

los que después de la extracción se necesitan de técnicas posteriores para limpiar la muestra (Luque y Jiménez 2000).

El sistema requerido para este tipo de extracción está constituido de manera general por una bomba de alta presión, una celda de extracción, una zona donde se descomprime el fluido y un sistema para coleccionar los analitos (figura 4).

Shimmo *et al.* (2004) analizó HAP acoplado en línea la extracción por fluidos supercríticos, la cromatografía de líquidos y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, mientras que Castells *et al.* (2003) reportó la aplicación de la extracción por fluidos supercríticos de oxi-HAP y nitro-HAP en partículas, en un procedimiento de extracción y limpieza simultáneas. Yang *et al.* (1995) estudiaron el efecto de la temperatura y la adición de un agente modificador en la extracción con CO₂ supercrítico y encontraron que, al incrementar la temperatura y agregando un modificador como el metanol, se pueden incrementar las recuperaciones de los HAP (Liu *et al.* 2007). Portet-Koltalo *et al.* (2009) reportaron en su estudio que la extracción de HAP, sus nitroderivados y n-alcanos adicionados a material de referencia certificado 1650 previamente extraído se favorece a presiones altas (30 MPa) y temperaturas bajas (75 °C) utilizando como fluido supercrítico el CO₂ y como modificadores o “co-disolventes” una mezcla de piridina/dietilamina. Las recuperaciones de HAP reportadas oscilaron entre 79 ± 15.1 % (benzo[*ghi*]perileno) y 97 ± 6.5 % (acenaftileno).



Figura 4. Extractor EFS Hewlett Packard modelo 7680T
Tomado de <http://www.ebay.com>

2.6.3 Extracción con fluidos presurizados EFP (extracción acelerada con disolvente)

La extracción con fluidos presurizados, también conocida como extracción acelerada con disolvente, se utilizó por primera vez en 1995. Esta técnica utiliza disolventes orgánicos y acuosos a elevadas temperaturas que pueden variar entre 120 y 200 °C y presiones cercanas a 1500 psi (Ritcher 2000) para obtener la extracción completa de los analitos de muestras sólidas y semisólidas. El método 3545 de la serie SW-846 de la EPA propone este sistema para la extracción de compuestos orgánicos en suelos. En la EFP, se usan cantidades menores de disolventes que las empleadas en los métodos de extracción convencionales.

En este sistema se aplica presión a una celda de extracción para evitar la ebullición del disolvente mientras que se eleva la temperatura dentro de la celda que contiene la muestra. Después del periodo de extracción, la celda se enfría a temperatura menor al punto de ebullición del disolvente, el extracto se hace pasar por un filtro de celulosa aplicando presión y se deposita en un vial para su posterior concentración. Debido a la alta temperatura y presión utilizadas, la cinética de extracción es más rápida que la del Soxhlet lo que reduce el tiempo de análisis. Ritcher (2000) reportó la extracción cuantitativa de hidrocarburos del diesel y aceites residuales en suelos, sedimentos y arcillas utilizando mezclas de disolventes y temperaturas cercanas a los 170 °C, aunque son necesarias etapas posteriores de limpieza de dichos extractos.

La extracción se lleva a cabo en instrumentos diseñados con este propósito, generalmente de la marca Dionex. Existen 2 etapas:

- Dinámica: en la cual, la celda conteniendo la muestra se calienta mientras que el disolvente se bombea hacia la celda de manera continua.
- Estática: se lleva a cabo una vez que la temperatura y la presión son constantes. Esta etapa puede repetirse 2 ó 3 veces, reemplazando el disolvente entre ellas.

Al final de la etapa estática se enjuaga la muestra nuevamente con disolvente. El volumen total considerando todas las etapas de la extracción es de 20 a 40 mL. Una aplicación de este sistema es la extracción de HAP en matrices sólidas. Lundstedt *et al.* (2000) evaluaron algunas variables de extracción como la cantidad de muestra, el

volumen de disolvente y de los enjuagues, la temperatura, la presión y el tiempo en la extracción de HAP en suelos y reportaron que una gran cantidad de muestra combinada con poco disolvente disminuye la eficiencia de la extracción, también observaron que a temperaturas bajas disminuye la eficiencia en la extracción de los HAP de bajo peso molecular, las demás variables estudiadas presentaron efectos menores en la recuperación de los analitos.

Wu *et al.* (2006) aplicaron esta técnica para analizar la distribución de HAP por tamaño de partículas atmosféricas de Tianjin, China. Perraudin *et al.* (2005) analizaron HAP en partículas por este método y Zhou *et al.* (2005) desarrollaron un aparato para la extracción a microescala por líquidos presurizados de HAP en muestras de PM₁₀. Di Filippo *et al.* (2010) utilizaron ésta técnica en el estudio de la distribución de HAP, sus metilderivados y nitroderivados en partículas atmosféricas según su tamaño. Por otra parte, Bergvall y Westerholm (2009) mediante la extracción por fluidos presurizados determinaron dibenzopirenos en las partículas emitidas por vehículos a diesel usando tolueno a 200 °C y 3000 psi y reportaron recuperaciones de 57 al 96 %. Turrio-Baldasari *et al.* (2003) evaluaron la eficiencia de la extracción de HAP por EFP en partículas emitidas por la combustión de diesel, las recuperaciones de HAP deuterados adicionados a materiales de referencias reportadas se encontraron entre 76.0 ± 0.2 % (indeno[1,2,3-cd]pireno) y 98.33 ± 0.02 % (criseno)



Figura 5. Extractor EFP marca Dionex modelo 350.
Tomado de <http://www.dionex.com>

2.6.4 Extracción asistida por microondas

La extracción de compuestos orgánicos por técnicas de extracción asistidas por microondas tienen sus primeros antecedentes en la década de los ochenta, desde entonces ha sido una herramienta útil tanto en el análisis ambiental como en tejidos de animales y de humanos, lo anterior debido a que requiere menor cantidad de disolvente, y de muestra, así como disminución en el tiempo de análisis.

Mediante la radiación de ondas electromagnéticas no ionizantes con frecuencias de 300 a 300 000 MHz se provoca el movimiento de las moléculas, causado por la migración de iones y la rotación de dipolos al alinearse con el campo magnético inducido por las ondas. La reducción en el tiempo que tarda en calentarse el disolvente en contacto con la muestra se atribuye a que el calentamiento no ocurre primero sobre el recipiente y posteriormente sobre el disolvente y la muestra, sino que el calentamiento es directamente sobre la muestra y el disolvente.

Los disolventes generalmente utilizados son: acetato de etilo, acetona, metanol, etanol, acetonitrilo y agua, pueden utilizarse pares de disolventes si es necesario. Entre mayor sea la constante dieléctrica del disolvente, mejor será su capacidad para convertir la radiación en calor, dicha constante y la afinidad por el analito de interés son los dos factores más importantes a considerar en su elección. Otros factores que determinan la eficiencia de esta técnica son la temperatura, la potencia de las microondas, el volumen de disolvente y el tiempo de exposición. De manera análoga a la extracción con fluidos presurizados existen equipos diseñados para la extracción asistida por microondas. Durante la extracción, el disolvente se introduce en la celda de manera continua y se mantiene una sobre-presión que permite tener al disolvente en estado líquido. También existe el uso de sistemas abiertos.

En el análisis ambiental, HAP, compuestos bifenilos policlorados, pesticidas y fenoles en matrices como suelo y sedimentos se han analizado por este método, sin embargo también se ha implementado esta técnica en compuestos de reciente interés como retardantes de flama, compuestos derivados de productos de uso personal, agentes surfactantes, etc. Lee *et al.* (2001) emplearon esta técnica para el análisis de HAP y compuestos carbonílicos en vías de tránsito de la ciudad de Hong Kong.

Karthikeyan *et al.* (2006) optimizaron y validaron un método de extracción de HAP en aeropartículas por extracción asistida por microondas a bajas temperaturas, las recuperaciones de éstos compuestos se encontraron entre 79 ± 6 % (benzo[k]fluoranteno) y 125 ± 3 % (antraceno) en material de referencia certificado 1649a (polvo urbano), mientras que en el material de referencia 1648 (material particulado urbano) oscilaron entre 84 ± 3 % (benzo[k]fluoranteno) y 128 ± 11 % (antraceno). Piñeiro-Iglesias *et al.* (2002) encontraron recuperaciones entre 20.1 ± 8.2 % (naftaleno) hasta 109 ± 8.2 % (fluoranteno) en la extracción de HAP deuterados fortificados sobre material de referencia certificado de partículas de diesel SRM 1650 usando cloruro de metileno como disolvente.



Figura. 6. Equipo de extracción por microondas MARSXpress (CEM Corporation) Tomado de <http://www.cem.com>

2.6.5 Extracción asistida por ultrasonido

En esta técnica, la energía proporcionada por las ondas ultrasónicas se utiliza para favorecer la desorción de los analitos de interés de la matriz sólida que los contiene. Las ondas de ultrasonido provocan la formación y posterior explosión de burbujas (cavitación) en el líquido en zonas próximas a las superficies sólidas, este fenómeno implica un cambio localizado de presión y temperatura, que favorece la penetración del disolvente de extracción en el sólido. Esto puede llevarse a cabo en un baño ultrasónico donde el medio en el que viajan las ondas es generalmente agua. Las celdas que contienen a la muestra y al disolvente se encuentran inmersas cuidando que el nivel de disolvente utilizado coincida al menos con el nivel de agua en el baño. También es común el uso de sondas o brazos disruptores ultrasónicos que se introducen en el contenedor con el disolvente en contacto con la muestra, una vez inmerso emite pulsos de ondas ultrasónicas (20-400 KHz) y duración programadas. Este método se

encuentra descrito para la extracción de orgánicos en matrices como suelos y sedimentos en el método 3550 de la serie SW-846 de la EPA. Algunas ventajas son: extracción simultánea de varias muestras, empleo de menor volumen de disolvente y tiempos de extracción considerablemente menores respecto al Soxhlet, el equipo necesario para su realización es mucho más sencillo y económico al requerido en las técnicas descritas anteriormente. Los resultados son comparables a la extracción por Soxhlet, por lo que es un método ampliamente usado por los laboratorios de prueba en el análisis ambiental.

Para la extracción de HAP en suelos contaminados se ha encontrado que aparentemente uno de los factores que influyen en el recobro es el número de anillos fusionados (Song *et al.* 2002), en este estudio se comparó la extracción por ultrasonido, por agitación y por Soxhlet, y no se encontró diferencia estadísticamente significativa en el uso de estas técnicas. También se identificaron como factores que influyen en la extracción: la humedad presente en la muestra, su nivel de contaminación y la polaridad del disolvente utilizado.

Martínez *et al.* (2004) aplicaron este método para comparar las recuperaciones de HAP extraídos con Soxhlet, recomendando el uso de ultrasonido debido a que es una técnica más rápida. Sin embargo, al compararla con la extracción por fluidos presurizados su desempeño fue deficiente debido a que no fue posible recuperar a todos los analitos. El estudio fue realizado en agua y sedimentos.

Bi *et al.* (2003) y Cincinelli *et al.* (2007) utilizaron esta técnica para determinar la distribución de HAP en la fases gaseosa y particulada del aerosol atmosférico en Guangzhou (China) y Prato (Italia) respectivamente. Chrysikou *et al.* (2009) reportaron la extracción de HAP, bifenilos policlorados (BPC) y pesticidas organoclorados (POC) en partículas atmosféricas mediante ultrasonido (3 periodos de 25 min) usando una mezcla de cloruro de metileno y hexano como disolvente.

Valle-Hernández *et al.* (2010) y Amador-Muñoz *et al.* (2011) emplearon la extracción asistida por ultrasonido en periodos de 30 minutos, para la determinación de nitro-HAP y compuestos orgánicos respectivamente presentes en PM_{2.5} y PM₁₀, ambos estudios se realizaron en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

2.7 Validación de métodos analíticos

Existen diversas definiciones para la validación de un método analítico. De acuerdo con la guía de EURACHEM (The Fitness for purpose of analytical methods 1998) para la validación de métodos en el laboratorio se pueden encontrar dos:

- 1) Es el proceso para establecer las características, el desempeño y las limitaciones de un método, así como la identificación de las influencias que pueden modificar esas características y la magnitud de dichas modificaciones. La validación puede responder a las siguientes preguntas: ¿Qué analitos puede determinar el método?, ¿En qué matrices?, ¿En presencia de qué interferencias?, en esas condiciones ¿Qué niveles de precisión y de exactitud se pueden alcanzar?.

- 2) Es el proceso para verificar que un método es adecuado para su propósito, es decir, para resolver un problema analítico particular.

La norma ISO/IEC 17025 “*Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración*” define a la validación de un método como la confirmación de que el método cumple los requisitos particulares para su uso específico, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas.

La validación de métodos emplea un conjunto de pruebas que establecen y documentan las características de rendimiento de un método, demostrando así que éste es adecuado para su propósito, dichas características son:

- Aplicabilidad
- Adecuación al propósito
- Interferencias
- Rango de trabajo
- Intervalo lineal de trabajo
- Calibración
- Límite de cuantificación
- Límite de detección
- Exactitud

- Sesgo
- Precisión
- Sensibilidad
- Especificidad
- Selectividad
- Recuperación
- Robustez

Antes de empezar el proceso formal de validación, debe acotarse el alcance del método analítico. Posteriormente se procede a desarrollar e implementar el procedimiento, identificando los factores que influyen en la eficiencia y sensibilidad del método, las posibles interferencias, etc. Con base en los objetivos y recursos del laboratorio se definirán las pruebas de la validación que se llevarán a cabo y los parámetros o los criterios de calidad que serán establecidos para satisfacer éstas.

A continuación se definen de manera general los parámetros involucrados en la validación de un método analítico (Eurachem 1998).

1) **Intervalo de trabajo:** conjunto de valores del mensurando para los que se pretende que el error de un instrumento de medición se encuentre dentro de límites especificados. En general, los laboratorios cuentan con experiencias previas acerca del intervalo de concentraciones en las que los analitos de interés se encuentran en la matriz, sobre todo si el método analítico a implementar tiene como propósito resolver un problema en específico. El intervalo de trabajo, generalmente se encuentra restringido en su parte inferior por los límites de detección y de cuantificación del método y en la parte superior por la pérdida de linealidad en la relación respuesta-concentración del instrumento.

2) **Límite de detección del método:** es la menor concentración de un analito que se puede detectar pero no necesariamente cuantificar bajo las condiciones establecidas de la prueba.

3) **Sensibilidad:** es el cambio en la respuesta del detector del instrumento debida al cambio en la magnitud de la concentración.

4) **Selectividad:** la capacidad de determinar de manera un analito en particular en una mezcla compleja con cierto grado de interferencia de otros componentes presentes en la misma (Araujo 2009).

5) **Especificidad:** la capacidad de determinar un analito en particular sin la presencia de interferentes, el término especificidad involucra el 100% de selectividad o la presencia de cero interferentes (Araujo 2009).

6) **Límite de cuantificación del método:** es el primer punto de la curva de calibración con la menor concentración del analito que puede determinarse con precisión y exactitud.

7) **Exactitud:** es la proximidad entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado como verdadero.

8) **Sesgo:** la diferencia entre el valor esperado de los resultados de prueba y un valor de referencia aceptado. Caracteriza el error sistemático en un procedimiento analítico dado y es la desviación positiva o negativa de la media de los resultados analíticos con respecto al valor reconocido como verdadero.

9) **Recuperación:** la fracción de analito adicionada a una muestra de prueba previa al análisis instrumental que se determina efectivamente por el método. Cuando se utilizan materiales de referencia certificados, es una medida de la exactitud y eficiencia del método, mientras que si se fortifica la matriz en el laboratorio, sólo es una medida de la eficiencia del método.

10) **Precisión:** es la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes bajo condiciones estipuladas. Depende sólo de la distribución de los errores aleatorios y no se relaciona con el valor verdadero o especificado.

9.1) **Repetibilidad:** es la concordancia entre los resultados de mediciones que se obtienen con el mismo método, con objetos de prueba idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo y dentro de intervalos de tiempo corto.

9.2) **Reproducibilidad:** es la concordancia entre los resultados de mediciones con el mismo método, con objetos de prueba idénticos, en el mismo laboratorio, por diferentes operadores y/o usando el mismo equipo a intervalos de tiempo largos.

11) **Calibración:** conjunto de operaciones que establecen, en condiciones específicas, la relación entre los valores de una magnitud indicados por un sistema de medición y los valores correspondientes de esa magnitud materializados por patrones.

12) **Robustez:** es una medida de la capacidad del método de permanecer inalterado, por pequeñas pero deliberadas alteraciones en los parámetros y provee información de la confiabilidad del mismo en su uso rutinario.

Los ensayos para determinar cada una de las características anteriormente descritas serán diseñados tomando en cuenta principalmente los siguientes factores:

- Los requisitos estadísticos utilizados para su evaluación (número de réplicas por ensayo, número de repeticiones del ensayo, etc).
- La experiencia previa del laboratorio (concentraciones a determinar, límites de detección y cuantificación instrumentales).
- Los recursos asignados a la validación (materiales de referencia certificados, cantidad de muestras con las que se cuenta, estándares, tamaño del lote de análisis, etc).

3. Objetivo

General

Estandarizar un método de extracción a microescala asistida por ultrasonido para determinar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en partículas emitidas por la combustión de diesel y de biodiesel.

Particulares

- Minimizar la cantidad de muestra, el volumen de disolvente y el tiempo de análisis requeridos en los procedimientos de referencia o anteriormente establecidos en el laboratorio para la extracción de HAP en partículas.
- Optimizar las variables experimentales para la extracción de los compuestos y la concentración de los extractos.
- Conocer la eficiencia y precisión del método de extracción a diferentes concentraciones.
- Determinar un modelo que relacione las concentraciones de HAP en la muestra y la respuesta del cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas y establecer su linealidad.
- Determinar los límites de detección y de cuantificación del método.
- Determinar la masa de HAP presentes en partículas emitidas por un motor en la combustión de diesel y biodiesel.

4. Desarrollo experimental

4.1 Celda de extracción a microescala asistida por ultrasonido acoplada a un sistema de filtración con y sin reflujo (CEMAUF – R/SR) diseñada en el laboratorio

Este equipo fue diseñado para usar menor cantidad de muestra y de disolvente en la extracción. Permite filtrar el extracto sin necesidad de trasvasarlo a una jeringa conectada al acrodisco, es decir, permite filtrar la muestra “en línea”, para incrementar la eficiencia en la recuperación y reducir la pérdida de masa por el tratamiento de la muestra.

El sistema cuenta con una chaqueta protectora para conservar la muestra y proteger al analista en caso de una fuga o fractura del sistema de extracción. La junta esmerilada acopla el cuerpo de la celda a un condensador mediante un conector, esta adaptación permite que el disolvente de extracción se encuentre en reflujo si la temperatura del baño ultrasónico supera su punto de ebullición. Este equipo está en proceso de patente No.MX/a/2012/000790



Figura 7. CEMAUF-SR sin chaqueta protectora con muestra



Figura 8. Extracción usando la celda en el sistema cerrado CEMAUF-SR

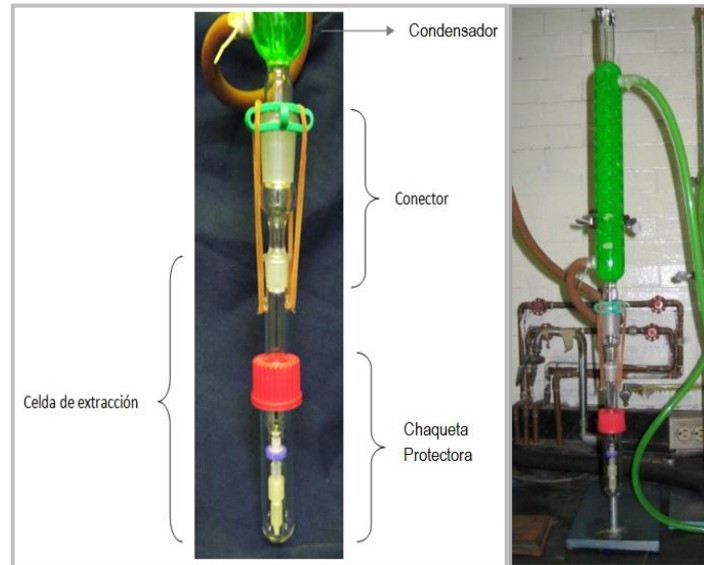


Figura 9. CEMAUF-R con chaqueta protectora acoplada a un condensador (sistema abierto)

4.2 Evaluación de las variables de operación en el tratamiento de la muestra

Uno de los objetivos fue utilizar la menor cantidad de disolvente. Tomando en cuenta las dimensiones de la celda y de la muestra, el volumen para cada extracción fue de 4 mL. El disolvente fue cloruro de metileno grado HPLC (B&J) que ha demostrado ser excelente extractante de HAP en partículas suspendidas atmosféricas (Villalobos-Pietrini *et al.* 2006, Amador-Muñoz *et al.* 2011).

Basados en estudios previos validados en el laboratorio (Amador-Muñoz 2003, Valle Hernández *et al.* 2010) las extracciones se llevaron a cabo en un baño ultrasónico WiseClean® modelo WVC-DO6H 550 Watts 14 A con 100% de potencia, sin pulsos y en periodos de 5 min cada extracción.

Antes de realizar la estandarización del método se evaluaron 4 variables experimentales.

- Número de extracciones
- Temperatura de extracción
- Técnica de reducción del volumen del cloruro de metileno
- Celda con y sin condensador

Los experimentos necesarios se llevaron a cabo empleando segmentos de 13 cm² de filtros con partículas atmosféricas $\leq 2.5 \mu\text{m}$, colectadas en un muestreador de alto volumen

durante diciembre del 2006 en la UAM-Iztapalapa. Un segmento se extrajo sin fortificar y los otros 2 se fortificaron con 90 ó 900 ng de 16 HAP dependiendo del experimento. A todos los extractos se les adicionó estándar interno y se inyectaron en un cromatógrafo de gases Agilent modelo 6890A con muestreador (G2614A) e inyector automático (G2613A) acoplado a un espectrómetro de masas Agilent modelo 5973N (Cuadrupolo).

Tabla V. Condiciones de operación en el CG-EM.

Cromatógrafo de gases	
Inyección	Inyector de vaporización con temperatura programable PTV (<i>Programmable Temperature Vaporization</i>). Temperatura 310°C. Volumen 1 µL, modo sin división (<i>splitless</i>)
Columna Cromatográfica	Tubo abierto DB-35MS marca J&W Scientific. Fase estacionaria 35 % de fenil, 65 % polidimetil-siloxano. Dimensiones: 29 m longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película. No. Serie: US9168713H
Fase móvil	Gas acarreador Helio Infra, grado cromatográfico, 99.998%, flujo: 1.2 mL min ⁻¹
Programa de Temperatura	40 °C – 1 min, 1er incremento a 50 °C min ⁻¹ hasta 110 °C - 0 min, 2do incremento a 5°C min ⁻¹ hasta 303 °C - 0 min, 3er incremento a 20°C min ⁻¹ , hasta 335 °C. Tiempo total de corrida: 52.6 min
Línea de transferencia	310 °C
Espectrómetro de masas	
Fuente de ionización	Impacto electrónico 70 eV. Temperatura: 230 °C, afinación: <i>autotune.a</i>
Cuadrupolo	150 °C
Filamento	No. 1, encendido a 5 min del inicio de corrida (<i>solvent delay</i>)
Modo de Adquisición	Monitoreo de iones seleccionados "SIM" 5 Grupos, 75 Iones.

Se utilizaron las áreas relativas A_r (ecuación 1)(adimensional) para calcular el porcentaje de recuperación (ecuación 2) y el coeficiente de variación (ecuación 3) entre los fortificados.

$$A_r = \frac{A_x}{A_{ei}} \quad \text{Ecuación (1)}$$

Donde A_x es el área correspondiente al HAP y A_{ei} es el área del estándar interno (HAP-deuterado, HAP-d).

$$\% \text{ Rec} = \frac{\text{Ar del fortificado} - \text{Ar del no fortificado}}{\text{Ar del estándar de referencia}} \quad \text{Ecuación (2)}$$

$$CV = \frac{s}{\bar{X}}$$

Ecuación (3)

Donde s es la desviación estándar de los porcentajes de recuperación y \bar{X} su promedio.

En la figura 10 se representan los ensayos realizados y las observaciones tomadas en cuenta para determinar cada una de las variables de operación del método.

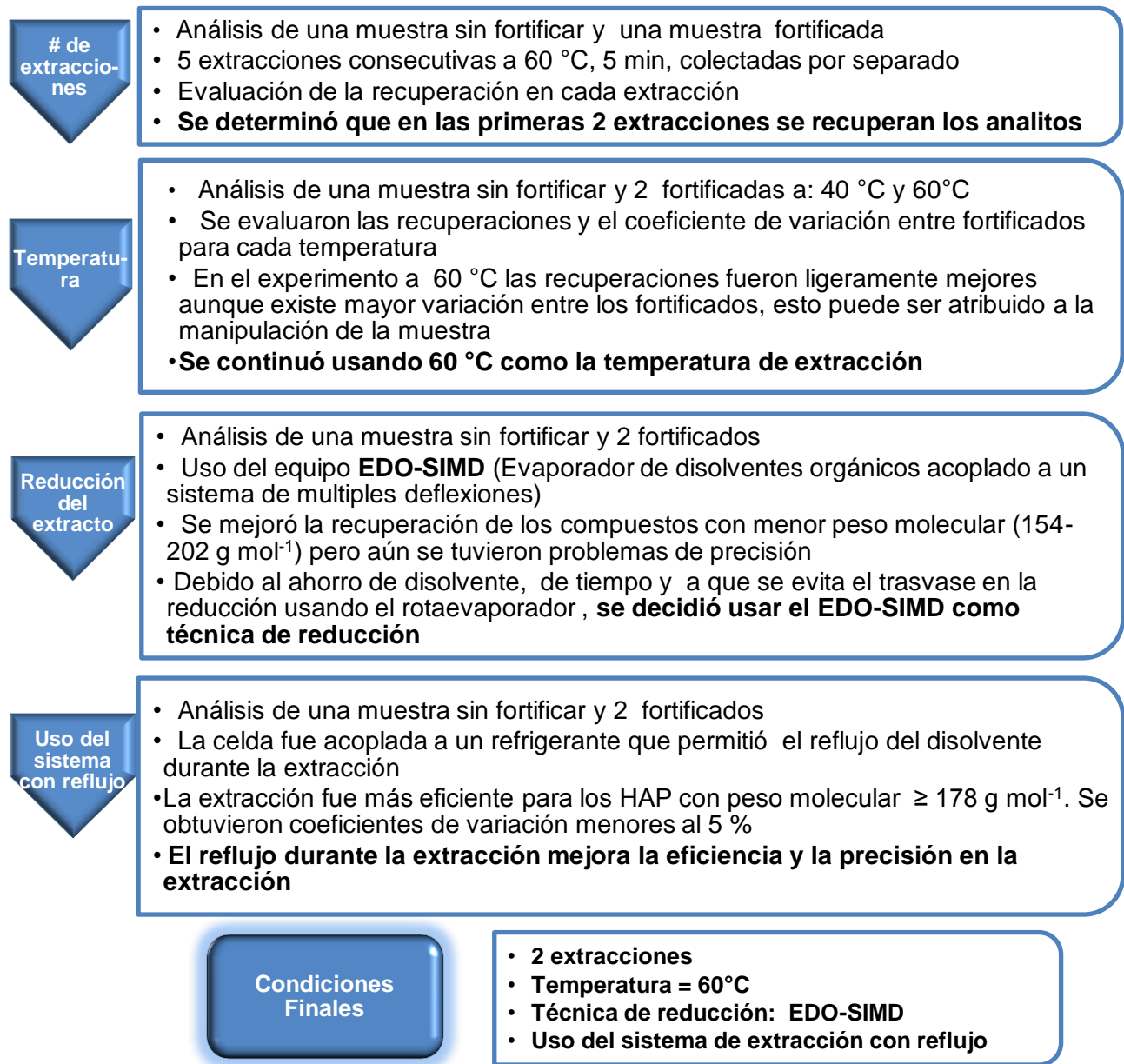


Figura 10. Secuencia de pruebas preliminares

4.2.1. Evaluación del número de extracciones

El experimento consistió en extraer 2 segmentos de filtro con partículas $\leq 2.5 \mu\text{m}$: uno de ellos sin fortificar y el otro fortificado con 90 ng de 16 HAP. El enriquecimiento se realizó 19 horas antes de la extracción para permitir a los analitos penetrar en las partículas y durante este periodo se almacenaron protegidos de la luz a -10°C .

Se extrajeron con 4 mL de cloruro de metileno, el sistema se utilizó de manera cerrada (celda con tapón), la temperatura del baño ultrasónico fue de $60 \pm 2^\circ\text{C}$, y el periodo de cada extracción fue 5 min (figura 11). Al terminar la sonicación, los extractos se filtraron y colectaron en matraces bola de fondo plano por separado. Este procedimiento se llevó a cabo 5 veces consecutivas, colectando cada extracción por separado.



Figura 11. CEMAUF-SR. Extracción de la muestra utilizando el sistema cerrado (celda con tapón)

Cada extracto se concentró en el rotaevaporador BÜCHI (modelo R-124) con baño de agua (modelo B480), hasta un volumen aproximado de 0.5 mL, una vez reducido, se colocó en un matraz aforado, se adicionó el estándar interno (Fenantreno d_{-10}) y se completó el aforo a 1 mL. Las muestras fueron analizadas en el CG-EM.

4.2.2. Evaluación del efecto de la temperatura

Para cada temperatura se extrajeron una muestra sin fortificar y 2 fortificados. El procedimiento fue el mismo al descrito en el apartado anterior, limitando el número de extracciones a 2 de manera consecutiva. Se evaluó el porcentaje de recuperación total y el coeficiente de variación entre fortificados.

4.2.3. Técnica de reducción

Se aumentó en un orden de magnitud la cantidad de masa de HAP en la fortificación (900 ng de HAP) para descartar la concentración adicionada como otra variable que pudiese afectar la recuperación de los analitos. Se llevaron a cabo 2 extracciones a 60°C durante 5 minutos con 4 mL de cloruro de metileno. En este ensayo se colectaron los extractos en un vial ambar de 12 mL, con tapa y septa de teflón. Una vez colectados los extractos se adaptó al **Evaporador de disolventes orgánicos por arrastre de vapor acoplado a un sistema de múltiples deflexiones para la recuperación de compuestos orgánicos (EDO-SIMD patente en trámite No. MX/a/2012/000791)** (figura 12).

Cabe mencionar que aunque no fue posible medir el flujo de N₂ (grado cromatográfico Infra 99.998%) que entra al vial se controló el procedimiento regulando la velocidad a la cual se evapora el cloruro de metileno. Al llegar a un volumen aproximado de 0.5 mL se enjuagó el capilar con múltiples deflexiones con disolvente, se le adicionó estándar interno y se aforó a 1 mL para su análisis por CG-EM

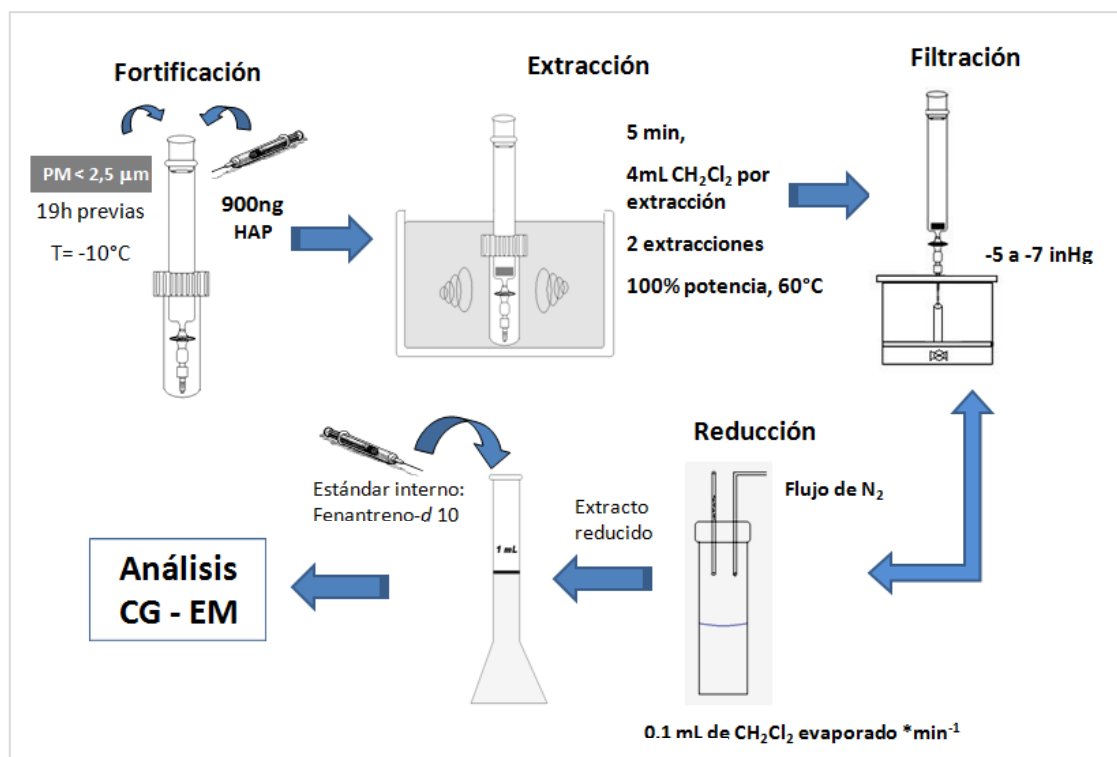


Figura 12. Esquema del procedimiento de extracción utilizando la técnica de evaporación por arrastre de vapor para la concentración del extracto

4.2.4. Sistema abierto y cerrado

El enriquecimiento de las partículas se realizó con 900 ng de HAP 19 h previas a la extracción. La celda se acopló a un condensador, permitiendo el reflujo del cloruro de metileno durante la sonicación y las condiciones de extracción fueron las descritas en el apartado anterior. Después de cada extracción se permitió alcanzar la temperatura ambiente y se enjuagó con disolvente las paredes interiores del serpentín del condensador. Al terminar la segunda extracción se repitió el enjuague de la celda, el conector y todas las juntas esmeriladas interiores. Posteriormente se redujo el volumen de los extractos en el equipo **EDO-SIMD**, se agregó el estándar interno y se aforó a 1 mL para su posterior análisis en CG-EM (figura 13).

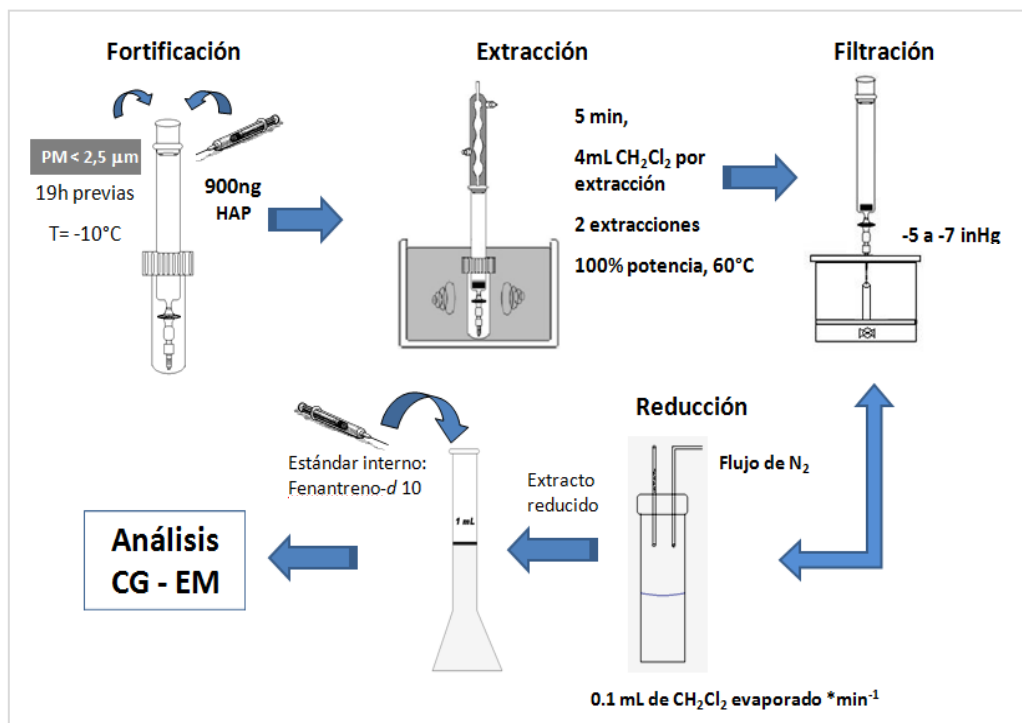


Figura 13. Esquema del procedimiento de extracción utilizando la celda acoplada a un condensador (Patente en trámite No. MX/a/2012/000789)

4.3 Estandarización del método

Una vez establecido el procedimiento para el tratamiento de la muestra, se estandarizó el método analítico. Para alcanzar este objetivo se realizaron las etapas mostradas en el siguiente diagrama (figura 14).

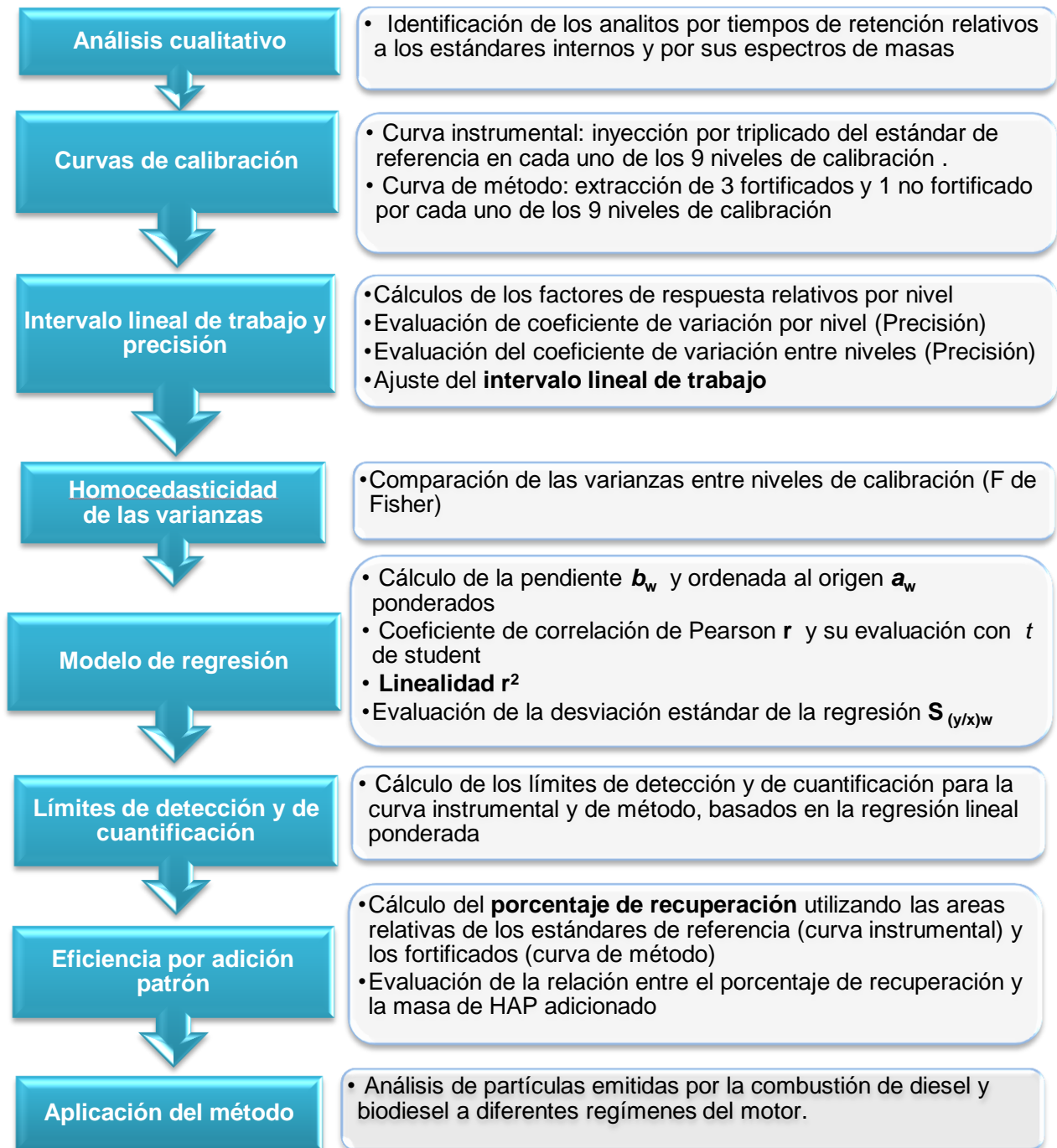


Figura 14. Parámetros evaluados en la estandarización del método analítico para determinar HAP en partículas emitidas por la combustión de diesel y biodiesel

4.3.1 Análisis cualitativo

4.3.1.1. Estándares

Los estándares de los HAP empleados en la estandarización del método analítico se muestran en las tablas VI y VII, mientras que la tabla VIII muestra los HAP deuterados utilizados como estándares internos para el análisis por CG-EM. Se incluyeron en el análisis HAP metilados debido a que existen reportes en la literatura que indican su presencia en la emisión de la combustión de diesel (Borrás *et al.* 2009).

Tabla VI. Hidrocarburos aromáticos policíclicos empleados en la estandarización del método analítico.

Compuesto	Marca	Pureza
Naftaleno	Supelco	96-99%
Acenaftileno	Supelco	96-99%
Acenafteno	Supelco	96-99%
Fluoreno	Supelco	96-99%
Fenantreno	Supelco	96-99%
Antraceno	Supelco	96-99%
Fluoranteno	Supelco	96-99%
Pireno	Supelco	96-99%
Benzo[a]fluoreno	UltraScientific	99%
Benzo[a]antraceno	Supelco	96-99%
Criseno	Supelco	96-99%
Trifenileno	UltraScientific	98%
Benzo[b]fluoranteno	Supelco	96-99%
Benzo[k]fluoranteno	Chem Service	98%
Benzo[e]pireno	UltraScientific	99%
Benzo[a]pireno	Supelco	96-99%
Perileno	Chem Service	99%
Tripticeno	UltraScientific	≥ 95 %
Indeno[1,2,3-cd]pireno	UltraScientific	99%
Benzo[ghi]perileno	Chem Service	99.20%
Dibenzo[a,c]antraceno	UltraScientific	97%
Dibenzo[a,h]antraceno	Supelco	96-99%

Tabla VII. Hidrocarburos aromáticos policíclicos metilados empleados en la estandarización del método.

Compuesto	Marca	Pureza
2-Metilantraceno	UltraScientific	97%
1-Metilantraceno	UltraScientific	≥95%
4,5-Metilenfenantreno	AccuStandard	95%
9-Metilantraceno	UltraScientific	96%
3,6-Dimetilfenantreno	UltraScientific	97%
9,10-Dimetilantraceno	UltraScientific	99%
7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno	UltraScientific	98%

Tabla VIII. Hidrocarburos aromáticos policíclicos deuterados utilizados como estándares internos.

Compuesto	Marca	Pureza
Naftaleno- d_8	Chem service	99.5%
Acenafteno- d_{10}	Chem service	99%
Fenantreno- d_{10}	Chem service	99%
Antraceno- d_{10}	Chem service	99%
Pireno- d_{10}	Chiron AS	99.8%
Benzo[a]antraceno- d_{12}	Chem service	≥ 98 %
Criseno- d_{12}	Chem service	99%
Benzo[b]fluoranteno- d_{12}	Chem service	≥ 98 %
Benzo[k]fluoranteno- d_{12}	Chem service	≥ 98 %
Benzo[a]pireno- d_{12}	Chiron AS	99.2%
Perileno- d_{12}	Chem service	99%
Benzo[ghi]perileno- d_{12}	Chem service	≥ 98 %

4.3.1.2 Identificación

Se calculó el tiempo de retención relativo t_{rr} (adimensional) conforme a la siguiente ecuación para cada uno de los HAP de la tabla VI y VII.

$$t_{rr} = \frac{t_{rx}}{t_{rei}} \quad \text{Ecuación (4)}$$

Donde t_{rx} es el tiempo de retención absoluto del HAP y t_{rei} es el tiempo de retención absoluto de su correspondiente estándar interno (HAP- d), ambos en minutos.

Además de los tiempos de retención relativos, se utilizaron los espectros de masas de los compuestos (Apéndice A) para la correcta asignación de cada uno de los HAP a los picos presentes en los cromatogramas, verificando que los iones secundarios tuvieran el mismo t_r que el ion principal seleccionado.

4.3.2 Análisis cuantitativo

Para determinar el intervalo de concentraciones de la curva de calibración se realizó una búsqueda en la literatura de valores de masa de HAP por miligramo de partícula colectada en emisiones de motores a diesel y biodiesel (Borrás *et al* 2009. , Portet-Koltalo *et al.* 2009), así como de los análisis preliminares de muestras reales en el laboratorio (Valle-Hernández *et al.* enviado).

Los resultados de las estimaciones preliminares y la literatura consultada mostraron una tendencia en la emisión; donde los compuestos de peso molecular entre 128 g mol^{-1} y 202

g mol^{-1} (a excepción del acenaftileno y acenafteno) y los HAP metilados se emitieron en mayor cantidad que los HAP con peso molecular entre 228 g mol^{-1} y 278 g mol^{-1} .

Para aquellos compuestos no reportados en la literatura pero hallados en las pruebas preliminares, se estimaron sus concentraciones en función de sus homólogos cromatográficamente más cercanos.

Tomando en cuenta el perfil de emisión mencionado y sus características cromatográficas, los compuestos se dividieron en dos grupos: el primero se preparó en un “intervalo de concentraciones bajas” y el otro en un “intervalo de concentraciones altas”. La tabla IX muestra las concentraciones de los niveles de calibración para cada uno de estos grupos en ng HAP por mg de partícula colectada.

Tabla IX. Niveles de la curva de calibración del método analítico para los dos grupos: HAP de bajo peso molecular, más HAP metilados (concentraciones altas) y HAP de alto peso molecular más acenaftileno y acenafteno (concentraciones bajas).

	[ng de HAP mg^{-1} partícula]								
Niveles concentración de la curva	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Intervalo de concentraciones altas	200.0	160.0	120.0	80.0	40.0	30.0	20.0	10.0	1.0
Intervalo de concentraciones bajas	21.0	18.5	16.0	13.5	11.0	8.5	6.0	3.5	1.0
	[ng de HAP totales]*								
Intervalo de masas altas	1000.0	800.0	600.0	400.0	200.0	150.0	100.0	50.0	5.0
Intervalo de masas bajas	105.0	92.5	80.0	67.5	55.0	42.5	30.0	17.5	5.0
*En 5 mg de partículas extraídas									

4.3.2.1 Preparación de las disoluciones “stock”

Para preparar las disoluciones “stock” de los HAP se pesó en un vial ambar con tapa, aproximadamente 1 mg de cada HAP en una balanza analítica marca Sartorius Analytic modelo A200S y sensibilidad de 0.1 mg previamente verificada con pesas de 1 y 20 mg (Apéndice B). Se depositó 1 mL de tolueno grado HPLC con una micropipeta de precisión marca Gilson (100 - 1000 μL) y se pesó nuevamente. Por último, las disoluciones se agitaron en un vortex y se guardaron a $-10 \text{ }^\circ\text{C}$. Se calcularon para todos los compuestos las concentraciones en ng de HAP mg^{-1} de disolución y la masa total en cada nivel de

concentración. En el caso de los HAP –deuterados (HAP-d) se pesaron entre 0.5 y 1.4 mg aproximadamente (tablas X, XI y XII).

Tabla X. Masas y concentraciones de las disoluciones “stock” de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).

Compuesto	Vial seco [g]	Vial + HAP [g]	Vial +HAP+ Tolueno [g]	Masa HAP [mg]	Masa Tolueno [mg]	HAP + Tolueno [mg]	[ng HAP mg ⁻¹ de disolución]	[ng HAP mL ⁻¹ de disolución]
Naftaleno	3.2270	3.2282	4.0989	1.2	870.7	871.9	1376	1200000
Acenaftileno	3.2263	3.2271	4.1019	0.8	874.8	875.6	914	800000
Acenafteno	3.2201	3.2216	4.0935	1.5	871.9	873.4	1717	1500000
Fluoreno	3.2100	3.2110	4.0857	1.0	874.7	875.7	1142	1000000
Fenantreno	3.2399	3.2410	4.1163	1.1	875.3	876.4	1255	1100000
Antraceno	3.2284	3.2297	4.1011	1.3	871.4	872.7	1490	1300000
Fluoranteno	3.2228	3.2241	4.0930	1.3	868.9	870.2	1494	1300000
Pireno	3.2171	3.2180	4.0826	0.9	864.6	865.5	1040	900000
Tripticeno	3.2285	3.2294	4.0938	0.9	864.4	865.3	1040	900000
Benzo[a]fluoreno	3.1970	3.1981	4.0675	1.1	869.4	870.5	1264	1100000
Benzo[a]antraceno	3.2181	3.2191	4.0903	1.0	871.2	872.2	1147	1000000
Trifenileno	3.2375	3.2387	4.1112	1.2	872.5	873.7	1373	1200000
Criseno	3.2582	3.2591	4.1298	0.9	870.7	871.6	1033	900000
Benzo[b]fluoranteno	3.2318	3.2330	4.0991	1.2	866.1	867.3	1384	1200000
Benzo[k]fluoranteno	3.2112	3.2123	4.0785	1.1	866.2	867.3	1268	1100000
Benzo[e]pireno	3.2198	3.2208	4.0886	1.0	867.8	868.8	1151	1000000
Benzo[a]pireno	3.1915	3.1930	4.0592	1.5	866.2	867.7	1729	1500000
Perileno	3.2311	3.2324	4.0984	1.3	866.0	867.3	1499	1300000
Dibenzo[a,c]antraceno	3.2070	3.2079	4.0737	0.9	865.8	866.7	1038	900000
Indeno[1,2,3-cd]pireno	3.2274	3.2284	4.0955	1.0	867.1	868.1	1152	1000000
Dibenzo[a,h]antraceno	3.2367	3.2376	4.0838	0.9	846.2	847.1	1062	900000
Benzo[ghi]perileno	3.2608	3.2616	4.1269	0.8	865.3	866.1	924	800000

Tabla XI. Masas y concentraciones de las disoluciones “stock” de hidrocarburos aromáticos policíclicos metilados (Me-HAP).

Me-HAP	Vial seco [g]	Vial + Me-HAP [g]	Vial+ Me-HAP + Tolueno [g]	Masa Me-HAP [mg]	Masa Tolueno [mg]	Me-HAP + Tolueno [mg]	ng Me-HAP mg ⁻¹ de disolución	[ng Me-HAP mL ⁻¹ de disolución]
4,5-Metilenfenantreno	3.2224	3.2232	4.0879	0.8	864.7	865.5	924	800000
1-Metilantraceno	3.2307	3.2314	4.0985	0.7	867.1	867.8	807	700000
2-Metilantraceno	3.2139	3.2151	4.0778	1.2	862.7	863.9	1389	1200000
9-Metilantraceno	3.1712	3.1725	4.0371	1.3	864.6	865.9	1501	1300000
9,10-Dimetilantraceno	3.2563	3.2572	4.1246	0.9	867.4	868.3	1037	900000
3,6-Dimetilfenantreno	3.2358	3.2368	4.1010	1.0	864.2	865.2	1156	1000000
7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno	3.2500	3.2508	4.1156	0.8	864.8	865.6	924	800000

Tabla XII. Masas y concentraciones de las disoluciones “stock” de hidrocarburos aromáticos policíclicos deuterados (HAP-*d*) (estándares internos).

HAP- <i>d</i>	Vial seco [g]	Vial + HAP- <i>d</i> [g]	Vial + HAP- <i>d</i> + Tolueno [g]	Masa HAP- <i>d</i> [mg]	Masa Tolueno [mg]	HAP- <i>d</i> + Tolueno [mg]	[ng HAP- <i>d</i> mg ⁻¹ de disolución]	[ng HAP- <i>d</i> mL ⁻¹ de disolución]
Naftaleno- <i>d</i> ₈	3.5030	3.5043	4.3667	1.3	862.4	863.7	1505	1300000
Acenafteno- <i>d</i> ₁₀	3.4480	3.4494	4.3116	1.4	862.2	863.6	1621	1400000
Fenantreno- <i>d</i> ₁₀	3.4345	3.4354	4.2960	0.9	860.6	861.5	1045	900000
Antraceno- <i>d</i> ₁₀	3.4486	3.4493	4.3117	0.7	862.4	863.1	811	700000
Pireno- <i>d</i> ₁₀	3.4289	3.4302	4.2937	1.3	863.5	864.8	1503	1300000
Benzo[<i>a</i>]antraceno- <i>d</i> ₁₂	3.4455	3.4463	4.3088	0.8	862.5	863.3	927	800000
Criseno- <i>d</i> ₁₂	3.4681	3.4686	4.3291	0.5	860.5	861.0	581	500000
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno- <i>d</i> ₁₂	3.2415	3.2429	4.1060	1.4	863.1	864.5	1619	1400000
Benzo[<i>k</i>]fluoranteno- <i>d</i> ₁₂	3.4323	3.4329	4.2914	0.6	858.5	859.1	698	600000
Benzo[<i>a</i>]pireno- <i>d</i> ₁₂	3.4114	3.4120	4.2699	0.6	857.9	858.5	699	600000
Perileno- <i>d</i> ₁₂	3.4595	3.4603	4.3205	0.8	860.2	861.0	929	800000
Benzo[<i>ghi</i>]perileno- <i>d</i> ₁₂	3.4249	3.4255	4.2844	0.6	858.9	859.5	698	600000

4.3.2.2 Preparación de las disoluciones madre, de trabajo y de fortificación para las curvas de calibración

El primer paso para construir las curvas de calibración instrumental y de método fue preparar 2 disoluciones de trabajo: una agrupando los compuestos en el “Intervalo de concentraciones altas” (**DTA**) y la otra agrupando a los compuestos en el “Intervalo de concentraciones bajas” (**DTB**). A partir de cada disolución de trabajo se prepararon las disoluciones de trabajo (**DTA1**, **DTA2**, **DTB1**, **DTB2**), de las que se tomaron y mezclaron alícuotas para preparar 9 disoluciones de fortificación (**DF**).

Finalmente, de cada disolución de fortificación se tomó una alícuota y se aforó a 1 mL para construir la curva instrumental, mientras que para construir la curva de método se fortificaron y extrajeron 3 fragmentos de los filtros con matriz (figura 15).

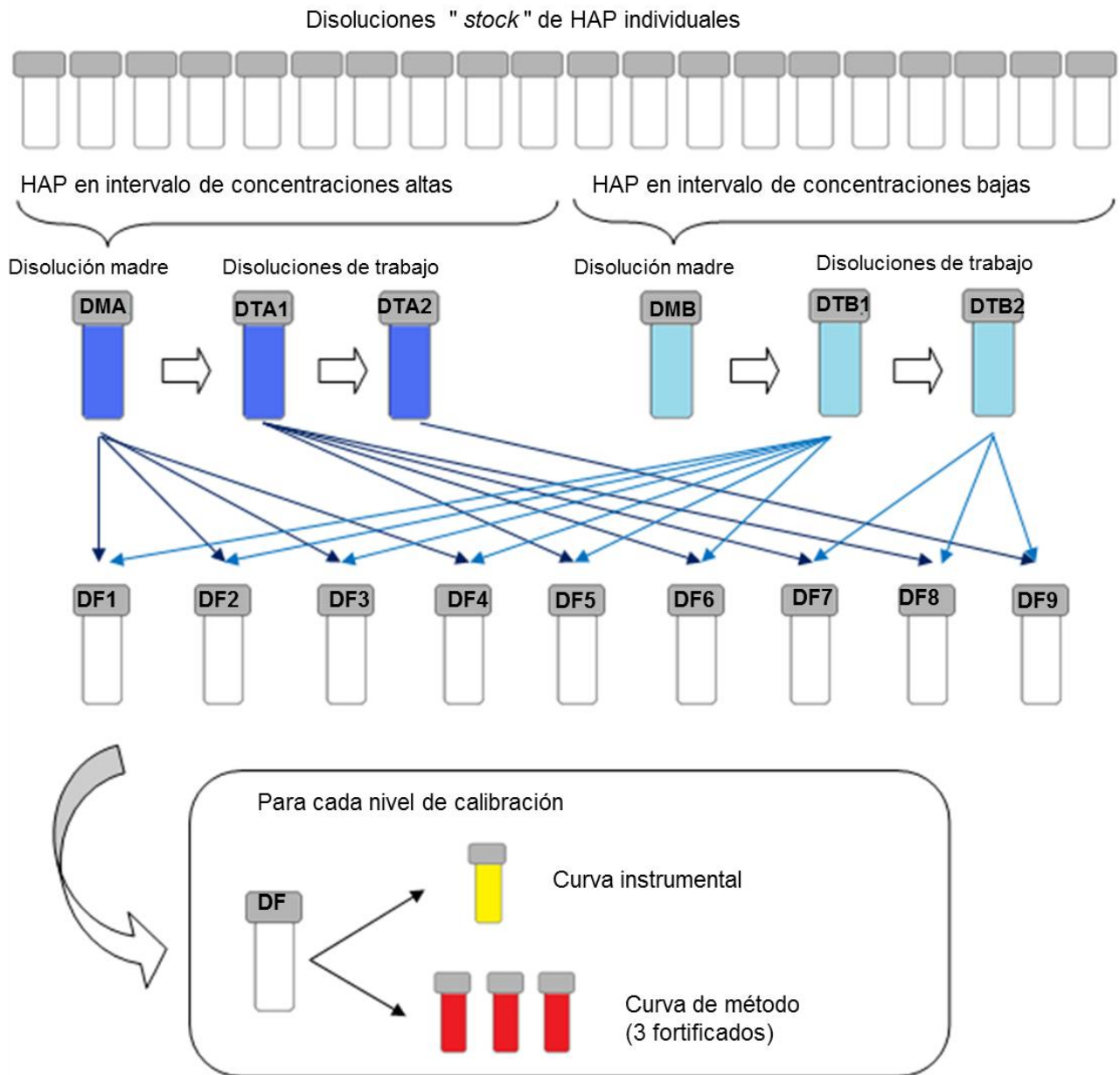


Figura 15. Preparación de las disoluciones madre, de trabajo y de fortificación para las curvas de calibración

Las tablas XIII y XIV, muestran los datos de la preparación de las disoluciones madre, DMA y DMB, respectivamente. En la segunda columna se encuentran los datos de la concentración de las disoluciones “stock” de cada compuesto en ng de HAP por mg de disolución. La preparación de cada disolución se realizó pesando en un vial ámbar cada una de las alícuotas mostradas en la tercera columna mas el volumen de tolueno agregado para obtener un volumen final de 1.85 mL con masa de 1588.2 mg.

Para obtener la concentración en ng HAP por mg de disolución madre se multiplicó la masa de HAP presente en la alícuota por la masa de la disolución de dicha alícuota y se dividió entre la masa final de la disolución madre (1588.2 mg) (ecuación 5). La última columna muestra la concentración en ng de HAP por mL de disolución (1.85 mL) según la ecuación 6.

$$\text{DMA, } \frac{\text{ng}}{\text{mg}} = \left[\frac{\text{ng de HAP}}{\text{mg de disolución "stock"}} \right] * \frac{[\text{mg de la alícuota}]}{[\text{mg de la disolución madre}]} \quad (\text{Ecuación 5})$$

$$\text{DMA, } \frac{\text{ng}}{\text{mL}} = \left[\frac{\text{ng de HAP}}{\text{mg de disolución "stock"}} \right] * \frac{[\text{mg de la alícuota}]}{[\text{mL de la disolución madre}]} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Por ejemplo, para el naftaleno

$$\frac{\text{ng de naftaleno}}{\text{mg de disolución DMA}} = \left[\frac{1376 \text{ ng}}{\text{mg}} \right] * \frac{[52.7 \text{ mg}]}{[1588.2 \text{ mg}]} = 45.67$$

$$\frac{\text{ng de naftaleno}}{\text{mL de disolución DMA}} = \left[\frac{1376 \text{ ng}}{\text{mg}} \right] * \frac{[52.7 \text{ mg}]}{[1.85 \text{ mL}]} = 39206.1$$

Tabla XIII. Disoluciones "stock" y disolución madre en concentraciones altas (DMA)

HAP	"Stocks" [ng mg ⁻¹]	Alícuota [μL]	Masa de la alícuota [mg]	Masa de HAP en la alícuota [μg]	DMA [ng mg ⁻¹]	DMA [ng mL ⁻¹]
Naftaleno	1376	62	52.7	72.5	45.67	39206.1
Fluoreno	1142	74	63.6	72.6	45.73	39258.2
Fenantreno	1255	67	57.6	72.3	45.52	39078.8
Antraceno	1490	57	49.5	73.7	46.43	39857.7
2-Metilantraceno	1389	62	53.2	73.9	46.53	39944.6
1-Metilantraceno	807	106	91.4	73.7	46.42	39852.3
4,5-Metilenfenantreno	924	93	79.7	73.9	46.38	39820.8
9-Metilantraceno	1501	57	48.5	72.8	45.85	39359.1
3,6-Dimetilfenantreno	1156	74	62.8	72.6	45.70	39234.8
Fluoranteno	1494	57	48.7	72.8	45.81	39326.2
9,10-Dimetilantraceno	1037	82	69.8	72.3	45.55	39107.2
Pireno	1040	82	70.2	73.0	45.96	39458.5
Tolueno agregado	-----	977	840.5	-----	-----	-----

Σ= 1850 Σ=1588.2

DMA Disolución madre a concentraciones altas

De manera similar, la DMB (Tabla XIV) se preparó aforando la disolución a 1 mL con masa de 828.0 ng.

Tabla XIV. Disoluciones “stock” y disolución madre en concentraciones bajas (DMB).

HAP	“Stocks” [ng mg ⁻¹]	Alícuota [μL]	Masa de la alícuota [mg]	Masa de HAP en la alícuota [μg]	DMB* [ng mg ⁻¹]	DMB* [ng mL ⁻¹]
Acenaftileno	914	31	26.5	24.2	29.24	24212.0
Acenafteno	1717	17	14.2	24.4	29.45	24387.5
Tripticeno	1040	28	23.1	24.0	29.02	24026.3
Benzo[a]fluoreno	1264	23	17.4	22.0	26.55	21987.4
Benzo[a]antraceno	1147	25	20.3	23.3	28.11	23274.5
Trifenileno** +	1373	10	7.1	9.8	11.78	9751.6
Criseno**	1033	14	9.6	9.7	11.97	9912.8
Benzo[b]fluoranteno	1384	21	15.7	21.7	26.24	21722.6
7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno	924	31	24.3	22.5	27.12	22458.4
Benzo[k]fluoranteno	1268	23	17.9	22.7	27.42	22702.6
Benzo[e]pireno	1151	25	16.3	18,8	22.66	18761.5
Benzo[a]pireno	1729	17	11.9	20.6	24.84	20571.6
Perileno	1499	19	13.6	20.4	24.62	20385.1
Dibenzo[a,c]antraceno	1038	28	21.8	22.6	27.34	22637.6
Indeno[123-cd]pireno	1152	25	19.5	22.5	27.13	22462.8
Dibenzo[a,h]antraceno	1062	28	22.6	24.0	29.00	24011.3
Benzo[ghi]perileno	924	31	25.0	23.1	27.89	23092.0
Tolueno agregado	-----	605	521.2-	-----	-----	-----
		Σ=1000	Σ=828.0			

* DMB Disolución madre a concentraciones bajas

**Se cuantificaron como la suma de los compuestos, por ello las concentraciones de cada uno están a la mitad

Como lo muestra la tabla IX el nivel 5 es la concentración intermedia de las curvas de calibración en ambos intervalos, siendo ésta la seleccionada para preparar los estándares internos.

De manera análoga a los HAP, también se prepararon mezclas por separado de sus homólogos deuterados; una correspondiente a los estándares internos de los compuestos a concentraciones altas (**DMA-d**) y otra agrupando a los HAP deuterados para los compuestos a concentraciones bajas (**DMB-d**). A partir de cada disolución madre se prepararon las disoluciones de trabajo (**DTA-d**, **DTB-d**), las que se mezclaron para preparar la disolución de estándares internos (**DEI**) con todos los compuestos deuterados como lo ilustra la figura 16.

Desarrollo experimental

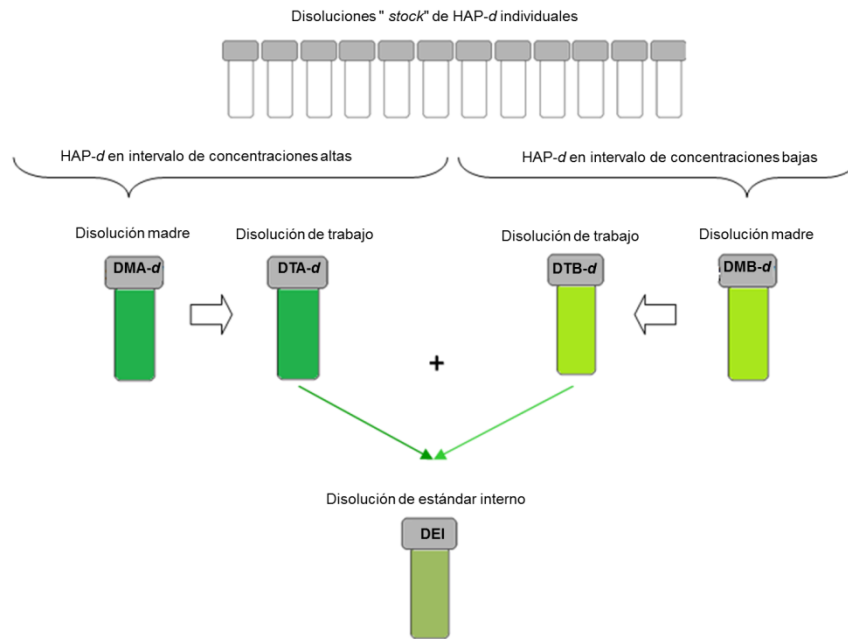


Figura 16. Preparación de las disoluciones madre, de trabajo y disolución de estándares internos

Las tablas XV y XVI muestran las concentraciones de las disoluciones "stock" de cada HAP-d de las que se partieron para preparar las disoluciones madre. En la segunda columna se encuentra la concentración de las disoluciones "stock" de cada compuesto en ng de HAP por mg de disolución. La preparación de cada disolución se realizó pesando en un vial ambar cada una de las alícuotas mostradas en la tercera columna mas el volumen de tolueno agregado, la suma de las alícuotas y el tolueno completaron un volumen final de 1.851 mL, con masa de 1588.7 mg.

Para obtener la concentración en ng de HAP por mg de disolución madre se multiplicó la masa de HAP presente en la alícuota por la masa de la misma y se dividió entre la masa final de la disolución (ecuación 5), en la última columna se muestra la concentración en ng de HAP por mL de disolución según la ecuación 6.

Tabla XV. Disolución madre a concentraciones altas de HAP-deuterados (DMA-d).

HAP-d	"Stocks" [ng mg ⁻¹]	Alícuota [μL]	Masa de la alícuota [mg]	Masa de HAP-d en la alícuota [μg]	DMA-d* [ng mg ⁻¹]	DMA-d* [ng mL ⁻¹]
Naftaleno-d ₈	1505	57	47.3	71.2	44.81	38460.9
Fenantreno-d ₁₀	1045	82	69.7	72.8	45.83	39336.7
Antraceno-d ₁₀	811	105	90.1	73.1	46.00	39476.6
Pireno-d ₁₀	1503	57	49.3	74.1	46.65	40036.1
Tolueno agregado	-----	1550	1332.3	-----	-----	-----
		Σ=1851	Σ=1588.7			
*DMA-d Disolución madre de deuterados a concentraciones altas						

De manera similar, la DMB-*d* (Tabla XVI) se preparó aforando la disolución a 1.85 mL con masa de 1639.4 ng

Tabla XVI. Disolución madre a concentraciones bajas de HAP-deuterados (DMB-*d*).

HAP- <i>d</i>	"Stocks" [ng mg ⁻¹]	Alícuota [μL]	Masa de la alícuota [mg]	Masa HAP- <i>d</i> en alícuota [μg]	*DMB- <i>d</i> [ng mg ⁻¹]	*DMB- <i>d</i> [ng mL ⁻¹]
Acenafteno- <i>d</i> ₁₀	1621	53	44.3	71.8	43.81	36828.5
Benzo[a]antraceno- <i>d</i> ₁₂	927	93	85.9	79.6	48.56	40821.3
Benzo[b]fluoranteno- <i>d</i> ₁₂	1619	53	36.8	60.0	36.35	30561.6
Benzo[k]fluoranteno- <i>d</i> ₁₂	698	125	106.3	74.2	45.29	38072.0
Benzo[a]pireno- <i>d</i> ₁₂	699	125	107	74.8	45.62	38349.5
Perileno- <i>d</i> ₁₂	929	92	78.8	73.2	44.66	37547.3
Benzo[ghi]perileno- <i>d</i> ₁₂	698	125	106.6	74.4	45.39	38161.7
Criseno- <i>d</i> ₁₂	581	100	83.3	48.4	29.51	24807.2
Tolueno agregado	-----	1184	990.4		-----	-----
			Σ=1850	Σ=1639.4		

*DMB-*d* Disolución madre de deuterados a concentraciones bajas

Para preparar las disoluciones de trabajo, **DTA1**, **DTB1**, **DTA-*d*** y **DTB-*d*** se tomaron alícuotas de las disoluciones madre **DMA**, **DMB**, **DMA-*d*** y **DMB-*d***, respectivamente aforadas con tolueno. Las concentraciones de cada compuesto en ng por mg de disolución se obtuvieron multiplicando su concentración en la disolución madre por la masa de la alícuota y dividiendo entre la masa total de la disolución (ecuación 7) mientras que las concentraciones en ng por mL de las disoluciones de trabajo se calcularon según la ecuación 8.

$$\left[\frac{\text{ng HAP}}{\text{mg disolución de trabajo}} \right] = \left[\frac{\text{ng de HAP}}{\text{mg de disolución madre}} \right] * \frac{[\text{mg de la alícuota}]}{[\text{mg totales de la disolución de trabajo}]} \quad (\text{Ecuación 7})$$

$$\left[\frac{\text{ng HAP}}{\text{mL disolución de trabajo}} \right] = \left[\frac{\text{ng de HAP}}{\text{mg de disolución madre}} \right] * \frac{[\text{mg de la alícuota}]}{[\text{mL totales de la disolución de trabajo}]} \quad (\text{Ecuación 8})$$

Utilizando las disoluciones DTA1 y DTB1, se llevó a cabo el mismo procedimiento para preparar las disoluciones de trabajo: DTA2, DTB2. Todas las disoluciones anteriores fueron preparadas en tolueno grado HPLC.

En la tabla XVII se registran las concentraciones en ng mL⁻¹ y ng mg⁻¹ en las disoluciones de trabajo (DTA1 y DTA2) de los HAP que conforman el grupo de concentraciones altas,

mientras que la tabla XVIII registra las concentraciones de los HAP del grupo de concentraciones bajas.

Tabla XVII. Disoluciones de trabajo de HAP a concentraciones altas (**DTA1 y DTA2**).

HAP	DTA 1			DTA 2		
	ng HAP	ng mL ⁻¹	ng mg ⁻¹	ng HAP	ng mL ⁻¹	ng mg ⁻¹
Naftaleno	3132.9	7832.2	9.07	34.5	689.1	0.807
Fluoreno	3137.0	7842.6	9.08	34.5	690.1	0.808
Fenantreno	3122.7	7806.8	9.04	34.3	686.9	0.804
Antraceno	3184.9	7962.4	9.22	35.0	700.6	0.820
2-Metilantraceno	3191.9	7979.7	9.24	35.1	702.1	0.822
1-Metilantraceno	3184.5	7961.3	9.22	35.0	700.5	0.820
4,5-Metilenfenantreno	3182.0	7955.0	9.21	35.0	699.9	0.820
9-Metilantraceno	3145.1	7862.8	9.10	34.6	691.8	0.810
3,6-Dimetilfenantreno	3135.2	7837.9	9.07	34.5	689.6	0.808
Fluoranteno	3142.5	7856.2	9.10	34.6	691.3	0.809
9,10-Dimetilantraceno	3125.0	7812.4	9.04	34.4	687.4	0.805
Pireno	3153.1	7882.6	9.13	34.7	693.6	0.812

Para preparar DTA 1 se tomaron 80 µL (68.6 mg) de DMA y se aforó a 400 µL con tolueno (345.5 mg).
 Para preparar DTA 2 se tomaron 5 µL (3.8 mg) de DTA1 y se aforó a 50 µL con tolueno (42.7 mg).

Tabla XVIII. Disoluciones de trabajo de HAP a concentraciones bajas (**DTB1 y DTB2**).

HAP	DTB 1			DTB 2		
	ng HAP	ng mL ⁻¹	ng mg ⁻¹	ng HAP	ng mL ⁻¹	ng mg ⁻¹
Acenaftileno	3535.3	5702.1	6.61	378.1	1080.1	1.28
Acenafteno	3560.9	5743.4	6.66	380.8	1088.0	1.29
Tripticeno	3508.2	5658.4	6.56	375.2	1071.9	1.27
Benzo[a]fluoreno	3210.5	5178.2	6.00	343.3	980.9	1.16
Benzo[a]Antraceno	3398.4	5481.3	6.35	363.4	1038.3	1.23
Trifenileno +	1423.9	2296.6	2.66	152.3	435.0	0.52
Criseno	1447.4	2334.5	2.71	154.8	442.2	0.52
Benzo[b]fluoranteno	3171.8	5115.8	5.93	339.2	969.1	1.15
7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno	3279.3	5289.1	6.13	350.7	1001.9	1.19
Benzo[k]fluoranteno	3314.9	5346.6	6.20	354.5	1012.8	1.20
Benzo[e]pireno	2739.5	4418.5	5.12	292.9	837.0	0.99
Benzo[a]pireno	3003.8	4844.8	5.62	321.2	917.7	1.09
Perileno	2976.5	4800.8	5.56	318.3	909.4	1.08
Dibenzo[a,c]antraceno	3305.4	5331.3	6.18	353.5	1009.9	1.20
Indeno[123-cd]pireno	3279.9	5290.2	6.13	350.7	1002.1	1.19
Dibenzo[a,h]antraceno	3506.0	5654.8	6.55	374.9	1071.2	1.27
Benzo[ghi]perileno	3371.8	5438.3	6.30	360.6	1030.2	1.22

Para preparar DTB 1 se tomaron 140 µL (120.9 mg) de DMB y se aforó a 620 µL con tolueno (414 mg).
 Para preparar DTB 2 se tomaron 70 µL (57.2 mg) de DTB1 y se aforó a 350 µL con tolueno (238.1 mg).

Con los compuestos deuterados se preparó la disolución de estándar interno **DEI** mezclando las disoluciones **DTA-d** y **DTB-d**, se trasvasaron las disoluciones de trabajo a un matraz aforado de 10 mL registrando la masa de cada una de ellas, se completó el aforo y se volvió a pesar. Las concentraciones mostradas en la tabla XIX se obtuvieron usando la ecuación 9.

$$\left[\frac{\text{ng HAP}}{\text{mL disolución est. interno}} \right] = \left[\frac{\text{ng de HAP}}{\text{mg en la disolución de trabajo}} \right] * \frac{[\text{mg de la alícuota}]}{[\text{mL totales de la disolución est. interno}]} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Tabla XIX. Disoluciones de trabajo y disolución de estándar interno de HAP-deuterados.

HAP-d	DTA-d			DEI*
concentraciones altas	ng HAP-d	ng mL ⁻¹	ng mg ⁻¹	ng mL ⁻¹
Naftaleno-d ₈	19139.4	18228.0	21.3	1851
Fenantreno-d ₁₀	19575.3	18643.1	21.8	1893
Antraceno-d ₁₀	19644.9	18709.4	21.8	1900
Pireno-d ₁₀	19923.3	18974.6	22.1	1927
HAP-d	DTB-d			
concentraciones bajas	ng HAP-d	ng mL ⁻¹	ng mg ⁻¹	
Acenafteno-d ₁₀	5624.7	5624.7	6.2	548
Benzo[a]antraceno-d ₁₂	6234.5	6234.5	6.9	607
Benzo[b]fluoranteno-d ₁₂	4667.6	4667.6	5.2	455
Benzo[k]fluoranteno-d ₁₂	5814.6	5814.6	6.4	567
Benzo[a]pireno-d ₁₂	5857.0	5857.0	6.5	571
Perileno-d ₁₂	5734.5	5734.5	6.4	559
Benzo[ghi]perileno-d ₁₂	5828.3	5828.3	6.5	568
Criseno-d ₁₂	3788.7	3788.7	4.2	369

*Para preparar DEI se tomó 1 mL de DTA-d (870.2 mg) y 1 mL de DTB-d (879.5mg) y se aforaron a 10 mL con cloruro de metileno.

Se prepararon las disoluciones con las que se fortificaron (**DF**) cada uno de los niveles de la curva de calibración del método y con las que también se preparó la curva de calibración instrumental, el volumen final de cada disolución de fortificación fue 0.30 mL.

Se utilizó un ¼ de filtro con partículas para la extracción de cada fortificado en la curva de método. A cada ¼ de filtro se le agregaron 0.05 mL de la disolución de fortificación conteniendo los ng de HAP correspondientes para obtener la masa calculada en cada nivel de la curva mostrados en la tabla IX. Por ejemplo, el nivel 5 indica 200 ng de HAP a concentraciones altas y 55 ng de HAP a concentraciones bajas, tomando en cuenta el volumen con el que se fortificó y el volumen final, la cantidad calculada de HAP en la **DF** para el nivel 5 se obtuvo de la siguiente manera:

HAP a concentraciones altas:

$$\frac{200 \text{ ng de HAP mg de partícula}^{-1}}{0.050 \text{ mL (vol. de adición)}} * 0.3 \text{ mL (vol. final de DF)} = 1200 \text{ ng de HAP}$$

HAP a concentraciones bajas:

$$\frac{55 \text{ ng de HAP mg de partícula}^{-1}}{0.050 \text{ mL (vol. de adición)}} * 0.3 \text{ mL (vol. final de DF)} = 330 \text{ ng de HAP mL}^{-1}$$

Una vez calculadas las concentraciones de todos los HAP en las disoluciones de fortificación, se calcularon los volúmenes de las alícuotas provenientes de las disoluciones madre o de trabajo necesarias para su preparación (figura 15). En la tabla XX se muestran los miligramos de las alícuotas tomadas de las disoluciones madre y de las de trabajo para cada DF.

Tabla XX. Preparación de las disoluciones de fortificación aforadas a 300 µL con tolueno.

	Masa requerida*		[mg] de disolución requeridos para la preparación de cada nivel									
	HAP a conc. altas	HAP a conc. bajas	DMA		DTA1		DTA2		DTB1		DTB2	
	[ng]*	[ng]*	vol. [µL]	masa [mg]	vol. [µL]	masa [mg]	vol. [µL]	masa [mg]	vol. [µL]	masa [mg]	vol. [µL]	masa [mg]
DF 1	6000	630	152	130.5	-----	-----	-----	-----	128	109.8	-----	-----
DF 2	4800	555	122	104.9	-----	-----	-----	-----	112	83.5	-----	-----
DF 3	3600	480	91	78.2	-----	-----	-----	-----	97	83.5	-----	-----
DF 4	2400	405	61	52.5	-----	-----	-----	-----	82	70.6	-----	-----
DF 5	1200	330	-----	-----	152	130.9	-----	-----	67	57.5	-----	-----
DF 6	900	255	-----	-----	114	97.8	-----	-----	52	44.7	-----	-----
DF 7	600	180	-----	-----	76	65.7	-----	-----	-----	-----	193	165.9
DF 8	300	90	-----	-----	38	32.9	-----	-----	-----	-----	112	96.5
DF 9	30	30	-----	-----	-----	-----	43	36.1	-----	-----	32	27.2

*ng de HAP en 300 µL de disolución de fortificación (DF)

Para ejemplificar, tomemos de nuevo el nivel 5 de la curva, la disolución de fortificación debe tener una masa aproximada de 1200 ng (concentración de 4000 ng mL⁻¹) para los HAP a concentraciones altas y de 330 ng (concentración de 1100 ng mL⁻¹) para los HAP a concentraciones bajas. Para su preparación se tomaron 152 µL de la disolución DTA1 que pesaron 130.9 mg y se mezclaron con 67 µL de la DTB1 cuyo peso fue de 57.5 mg, finalmente se agregaron 81 µL de tolueno para completar el volumen final de 300 µL.

4.3.3. Tratamiento de la muestra

4.3.3.1. Colecta y preservación de las muestras empleadas como matriz para la estandarización

Se colectaron partículas de la emisión de la combustión de un motor a diesel empleando filtros de fibra de vidrio con recubrimiento de teflón. Estos filtros fueron acondicionados previamente extrayéndolos en ultrasonido con acetona y posteriormente con cloruro de metileno durante 8 min para retirar la materia orgánica. Después se secaron y se pesaron en la balanza analítica, previamente verificada con pesas de 1 mg y 20 mg E2 (apéndice B). Los filtros se envolvieron en papel aluminio y se mantuvieron en refrigeración durante su transporte.

Previo al muestreo, el motor sin carga (Mercedes Benz modelo 2002) permaneció prendido 10 a 15 min para precalentarlo. Posteriormente se encendió la bomba de vacío durante 20 min. La temperatura dentro de la cámara de muestreo fue 80 °C.

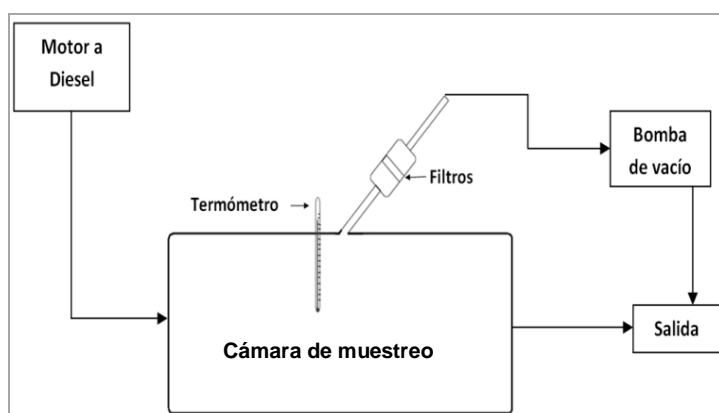


Figura 17. Colecta de partículas $\leq 2.5 \mu\text{m}$ emitidas por la combustión de diesel

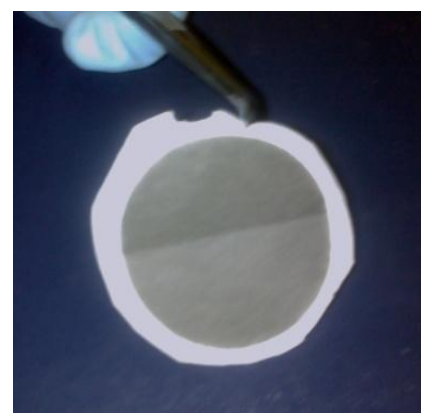


Figura 18. Filtro de fibra de vidrio recubierto con teflón después del muestreo

Al término de cada muestreo se retiraron los filtros de los portafiltros y se envolvieron en papel aluminio. La masa de partículas colectadas se obtuvo mediante la diferencia de la masa del filtro antes y después de la colecta. En promedio se colectaron 20 mg de partículas por filtro.

Una vez colectadas, se almacenaron a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su extracción. Durante su transporte y almacenamiento se evitó la exposición de los filtros a la luz, mientras que las extracciones se llevaron a cabo con luz amarilla para evitar su foto-oxidación.

4.3.3.2 Preparación de la matriz

La extracción de las muestras indicó que la cantidad de materia orgánica extraída (MOE) superaba el 90 % en masa, debido probablemente a la falta de carga del motor que provocó una baja eficiencia en la combustión del diesel. Para evitar interferencias debidas a este problema que ocasionó la presencia en el filtro de diesel no quemado, estos fueron extraídos en un baño ultrasónico a 60 °C durante 30 min para dejar únicamente a los filtros con las partículas emitidas, utilizadas como la matriz para la curva de método.

4.3.3.3 Fortificación de los filtros para la extracción de la curva de método

Cada filtro se dividió en cuartos (figura 19); a uno de ellos no se le adicionaron HAP, mientras que los otros tres fueron fortificados con 50 µL de la disolución de fortificación de cada nivel de la curva de calibración.

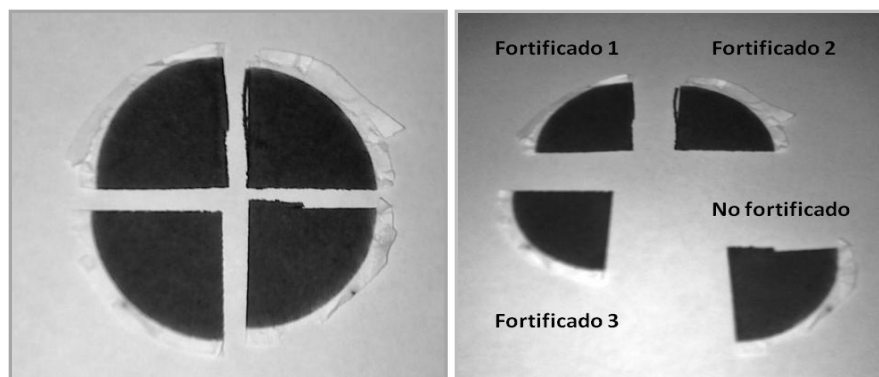


Figura 19. Filtro dividido con partículas de la emisión por combustión de diesel $\frac{1}{4}$ como blanco de los fortificados y $\frac{3}{4}$ para 3 réplicas de fortificados

La fortificación se llevó a cabo en la celda de forma que el contacto de los analitos fuese lo más homogéneo posible con las partículas (figura 19). Este procedimiento se realizó al menos 19 h antes de su extracción almacenándolos a -10 °C.

4.3.3.4 Procedimiento de extracción

Todo el material de vidrio se lavó previamente, se enjuagó con agua destilada, acetona y finalmente con cloruro de metileno para evitar cualquier contaminación cruzada.

A la muestra en la celda se le adicionaron 4 mL de cloruro de metileno, que fue la cantidad adecuada para cubrir la muestra completamente (figura 20).

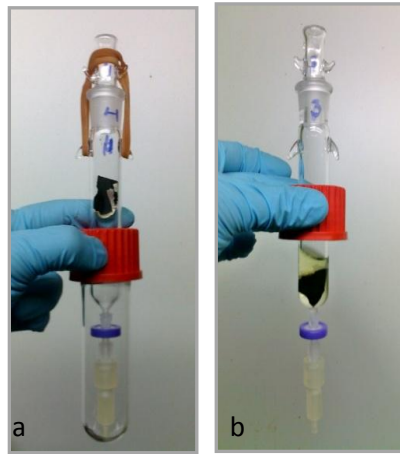


Figura 20. Celda de extracción con la muestra a. antes y b. después de la adición del disolvente

La celda con la muestra se acopló al condensador (figura 21) mediante un conector con junta esmerilada (figura 22), que sella el sistema y evita fugas durante el reflujo del disolvente (patente en trámite No. MX/a/2012/000790)



Figura 21. Condensadores con conectores de juntas esmeriladas



Figura 22. Celdas acopladas a los condensadores

Posteriormente, las celdas se colocaron dentro del baño ultrasónico a 60 °C cuidando que el nivel de agua en el baño coincidiera con el nivel de disolvente dentro de la celda (figura 23). La sonicación fue al 100 % de potencia sin pulsos y durante 5 min.



Figura 23. Extracción dentro del baño ultrasónico

Una vez terminada la extracción, se les dejó enfriar a temperatura ambiente, se enjuagaron tanto las paredes internas del condensador como la junta esmerilada del conector con la mínima cantidad de cloruro de metileno posible.

Para filtrar el extracto, se colocó la celda en el Visiprep SUPELCO (figura 24), se abrió la válvula giratoria y se hizo vacío con una bomba, el extracto pasó a través del filtro de PTFE de 13 mm de diámetro con un tamaño de poro de 0.22 μm marca GRACE ubicada entre la celda y la válvula del visiprep (figura 25), recibiendo en un vial ambar el extracto. Antes de filtrar la totalidad del extracto se enjuagaron las paredes de la celda con cloruro de metileno. El extracto y sus enjuagues se colocaron en un vial ambar (figura 26) y se guardaron a -10°C .



Figura 24. Visiprep 24 SUPELCO® modelo 5-7250 conectado a la bomba de vacío

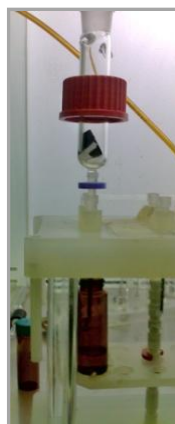


Figura 25. Filtración



Figura 26. Volumen total del extracto

Este procedimiento (extracción-filtración) se repitió 2 veces colocando ambos extractos en el mismo vial con un volumen total entre 10 y 12 mL.

Posteriormente, se colocó la tapa bihoradada del evaporador de disolventes orgánicos por arrastre de vapor acoplado a un sistema con múltiples deflexiones (No de patente en trámite MX/a/2012/00791) y se conectó al flujo de nitrógeno. En este sistema el N_2 entra por uno de los orificios de la tapa del vial y el disolvente que se arrastra por el gas sale por el capilar de vidrio con múltiples deflexiones insertado en misma la tapa (figuras 27 y 28). Se concentraron todos los extractos hasta un volumen aproximado de 0.5 mL, con una pipeta pasteur se transfirió el extracto a un matraz aforado y se enjuagó el capilar, con ese mismo disolvente de enjuague se completó el aforo a 1 mL.

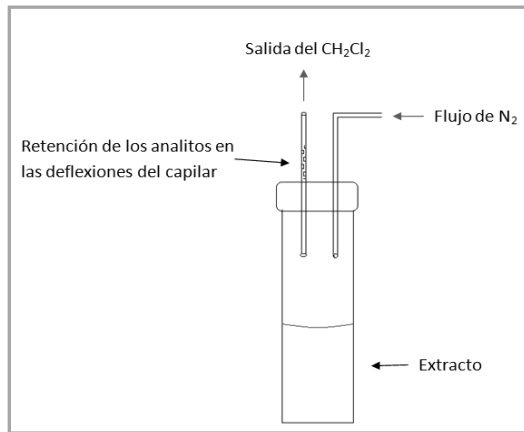


Figura 27. Esquema para la concentración de los extractos



Figura 28. Viales para la concentración de los analitos

Después del aforo, los extractos se colocaron en viales ámbar y se guardaron a -10°C hasta el momento de su análisis cromatográfico

4.3.4 Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

Se tomó una alícuota de $360\ \mu\text{L}$ de cada vial aforado (curva de método, curva instrumental y muestras reales), se depositó en un vial de inyección con inserto y se le adicionaron $40\ \mu\text{L}$ de la disolución de estándar interno. La curva instrumental se inyectó por triplicado, mientras que todos los demás extractos se inyectaron por duplicado. Todas las muestras se analizaron por CG-EM con las condiciones señaladas en la tabla V.

4.3.5 Determinación de los parámetros de estandarización del método

4.3.5.1 Intervalo lineal de trabajo y precisión

Se calcularon los factores de respuesta relativos (F_{rr}) (ecuación 10) por compuesto para cada nivel de ambas curvas de calibración mediante el cociente de las áreas relativas (A_r) y las concentraciones relativas (C_r) como lo muestra la ecuación 11.

$$F_{rr} = \frac{A_r}{C_r} \quad (\text{Ecuación 10})$$

y

$$C_r = \frac{C_x}{C_{ei}} \quad (\text{Ecuación 11})$$

donde A_r = área relativa

C_r = concentración o masa relativa

C_x = concentración o masa del HAP

C_{ei} = concentración o masa del estándar interno, HAP – d

Las áreas relativas correspondientes a la curva del método se calcularon restando las áreas relativas de los fortificados, de las no fortificadas en cada nivel. Posteriormente se calcularon los factores de respuesta relativos.

El intervalo lineal de trabajo quedó delimitado eliminando los niveles de concentración cuyo coeficiente de variación fuera mayor a 20 % y con ello se determinó el rango, que representa la magnitud de éste intervalo, restando las masas máximas y mínimas de HAP.

$$\text{Rango} = \text{masa máx. de HAP} - \text{masa mín. de HAP} \quad (\text{Ecuación 12})$$

La precisión del método se evaluó en cada nivel y entre todos los niveles. Para evaluar la precisión por nivel se calculó el coeficiente de variación de los F_r entre los triplicados de cada concentración de la curva instrumental, mientras que para la curva de método se calculó entre los fortificados del mismo nivel.

La precisión en el intervalo de calibración se evaluó calculando el coeficiente de variación de los factores de respuesta relativos entre los distintos niveles de la curva de calibración.

4.3.5.2 Homocedasticidad

Se evaluó la homocedasticidad de las varianzas dentro del intervalo de calibración mediante el estadístico “F de Fisher” descrito por la ecuación 13.

$$F = \frac{S_a^2}{S_b^2} \quad (\text{Ecuación 13})$$

Donde S_a^2 y S_b^2 se disponen en la ecuación de modo que F sea siempre ≥ 1 , la hipótesis nula H_0 es “las varianzas son iguales” y la hipótesis alternativa H_a es “las varianzas son diferentes”. Si el valor de $F_{\text{calculado}}$ es mayor al valor F de tablas a $n - 1$ grados de libertad, se rechaza H_0 (Miller y Miller 2002).

4.3.5.3 Regresión lineal ponderada

Si al menos una relación entre las varianzas de los distintos niveles fue diferente, no hubo homocedasticidad en el intervalo de calibración, lo que sugirió la transformación de las variables o el uso de una regresión lineal ponderada. Al usar este modelo se le dió a cada nivel un peso proporcional a su varianza y la recta ajustada pasaría más cerca de aquellos puntos con menor varianza que de los puntos donde ésta fue mayor, la manera de asignar este peso es utilizando un ponderador W que es inversamente proporcional a la varianza del nivel de calibración correspondiente (ecuación 14).

$$W_i = \frac{S_i^{-2}}{\sum_i S_i^{-2}/n} \quad (\text{Ecuación 14})$$

En el caso de la curva instrumental, las áreas fueron el promedio de las tres inyecciones de cada nivel mientras que en el método fueron el promedio de las áreas de los tres fortificados.

La línea recta resultante de la regresión lineal ponderada tiene pendiente b_w

$$b_w = \frac{\sum_i w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2} \quad (\text{Ecuación 15})$$

y ordenada a_w

$$a_w = \bar{y}_w - b_w \bar{x}_w \quad (\text{Ecuación 16})$$

Donde

$$\bar{y}_w = \sum_i \frac{w_i y_i}{n} \quad (\text{Ecuación 17})$$

$$\bar{x}_w = \sum_i \frac{w_i x_i}{n} \quad (\text{Ecuación 18})$$

\bar{x}_w e \bar{y}_w representan los centros de gravedad ponderados (Miller y Miller 2002).

También se calculó el estadístico $S_{(y/x)_w}$ ponderado que estima los errores aleatorios en la dirección “ y ” mediante la ecuación 19.

$$S_{(y/x)w} = \sqrt{\frac{\sum_i w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (\text{Ecuación 19})$$

Se calculó el coeficiente de correlación r (ecuación 20), evaluado con el estadístico t (ecuación 21). Si el valor de $t_{\text{calculado}}$ fue mayor o igual al valor de t de tablas a un nivel del 99 % de confianza con $n-2$ grados de libertad, se rechazó la hipótesis nula (H_0) “No hay correlación lineal”.

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{\{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]\}}} \quad (\text{Ecuación 20})$$

$$t = \frac{|r| \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (\text{Ecuación 21})$$

Otro parámetro usado para evaluar la linealidad del método, fue el coeficiente de determinación dado por r^2 , ya que es una medida del porcentaje de varianza explicada por el modelo, el que fue evaluado a través de un análisis de varianza (ANOVA) empleado como herramienta adicional para evaluar la linealidad del método. Este análisis consiste en dividir la variación total de y en dos varianzas: aquella explicada por la regresión y la debida al error (figura 29).

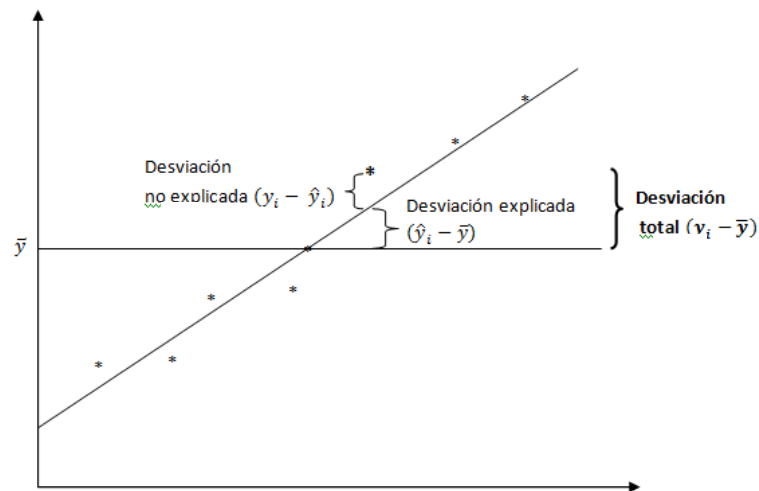


Figura 29. Varianza total de la regresión lineal integrada por: la explicada y la no explicada.

La suma de los cuadrados de la desviación total se expresa en términos de la suma de los cuadrados de cada una de las desviaciones según la ecuación 22.

$$\sum_i (y_i - \bar{y})^2 = \sum_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (\text{Ecuación 22})$$

Donde $\sum_i (y_i - \bar{y})^2$ es la suma de cuadrados total.
 $\sum_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2$ es la suma de cuadrados de la regresión (explicada).
 $\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2$ es la suma de cuadrados de los residuales (no explicada).

Si la ecuación 22 se divide entre la suma de cuadrados totales se obtiene la ecuación 23

$$1 = \frac{\sum_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_i (y_i - \bar{y})^2} + \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_i (y_i - \bar{y})^2} \quad (\text{Ecuación 23})$$

O bien,

$$\frac{\sum_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_i (y_i - \bar{y})^2} = 1 - \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}$$

Donde $\frac{\sum_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}$ es igual al coeficiente de determinación r^2 , que puede variar entre 0 y 1. Si r^2 es igual a 1 entonces $y_i - \hat{y}_i = 0$ y por lo tanto todos los puntos están sobre la recta de regresión, por el contrario, si r^2 es igual a 0, la línea de regresión (\hat{Y}) y la recta promedio (\bar{Y}) coinciden, por lo tanto no hay variación explicada por el modelo (Márquez de Cantú 1998).

La tabla de análisis de varianza para el modelo de regresión (tabla XXI) muestra el cálculo de F, donde la hipótesis nula a probar es H_0 "El modelo no es lineal" y la hipótesis alterna es H_a "El modelo es lineal". Si $F_{\text{calculada}}$ es mayor a la F de tablas a un nivel de confianza ≤ 0.05 se rechaza H_0 .

Tabla XXI. Tabla de ANOVA para la regresión.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F calculada
Regresión (explicada)	$\sum_i (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$2 - 1 = 1$	$CM_{exp} = \sum_i (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2 / 1$	$F = \frac{CM_{exp}}{CM_{no\ exp}}$
Residual (no explicada)	$\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2$	$n - 2$	$CM_{no\ exp} = \sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2 / n - 2$	
Total	$\sum_i (y_i - \bar{y}_i)^2$	$1 + (n - 2) = n - 1$		

El análisis de varianza se realizó con el software *Stadística 8.0 Statsoft Inc* introduciendo en el programa las concentraciones relativas como variable independiente y las áreas relativas como variable dependiente.

4.3.5.4 Límites de detección y de cuantificación

Una vez calculadas las ordenadas al origen de las rectas de regresión ponderada a_w y las desviaciones $S_{(y/x)w}$ de las curvas de método e instrumentales, se calcularon los límites de detección y de cuantificación de ambas curvas para cada compuesto (Miller y Miller 2002). El límite de detección está dado por el valor de la ordenada al origen más 3 veces la desviación de la regresión (ecuación 24).

$$LD = a_w + 3 S_{(y/x)w} \quad (\text{Ecuación 24})$$

Mientras que el límite de cuantificación equivale a la ordenada al origen más 10 veces la desviación de la regresión (ecuación 25).

$$LC = a_w + 10 S_{(y/x)w} \quad (\text{Ecuación 25})$$

Para obtener los límites instrumentales y de método en unidades de masa [ng de HAP] se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$LD \text{ [ng de HAP]} = [\text{ng de Estándar Interno}] \times \frac{3 S_{(y/x)w}}{b_w} \quad (\text{Ecuación 26})$$

$$LC \text{ [ng de HAP]} = [\text{ng de Estándar Interno}] \times \frac{10 S_{(y/x)w}}{b_w} \quad (\text{Ecuación 27})$$

4.3.5.5 Evaluación de la eficiencia por el método de adiciones patrón sobre matriz

Como se explicó en el apartado 4.3.2.2 se tomaron 50 μL de las disoluciones de fortificación (**DF**) y se aforaron a 1 mL para construir las curvas de calibración instrumentales, para las de método se tomó la misma alícuota y con ella se fortificaron fragmentos de filtro, cuyos extractos se llevaron al mismo aforo. Por lo tanto, los ng de cada HAP presentes en el nivel de concentración de la curva de calibración instrumental

fueron considerados como los estándares de referencia. La ecuación 2 se utilizó para calcular la eficiencia del método analítico a diferentes niveles de masa adicionada.

4.3.6 Aplicación del método analítico para determinar HAP en partículas emitidas por la combustión de diesel y de biodiesel

Finalmente se aplicó el método propuesto a 4 muestras de la emisión de diesel y a 4 muestras de la emisión de biodiesel B10 a diferentes regímenes del motor señalados en la tabla XXII.

Tabla XXII. Muestras de partículas emitidas por la combustión de diesel y de biodiesel B10.

Identificación de la muestra	Combustible utilizado	Revoluciones por minuto (rpm \pm 5)	mg en $\frac{1}{4}$ de filtro extraído
L9	Diesel 500	800	5.0
L7	Diesel 500	1200	3.7
L5	Diesel 500	1500	4.7
L3	Diesel 500	2000	5.9
FT1	B10	805	5.7
M3	B10	1200	3.7
FT9	B10	1603	5.7
FT11	B10	1803	6.0

5. Resultados y discusión

5.1 Evaluación de las variables de operación

5.1.1 Evaluación del número de extracciones

La tabla XXIII muestra el porcentaje de recuperación de las 5 extracciones realizadas de manera consecutiva y colectadas por separado, la mayor masa de HAP se recuperó en las primeras 2 extracciones.

Tabla XXIII. Porcentaje de distribución de HAP recuperados en cada extracción utilizando el sistema cerrado, ultrasonido, 4 mL, 5 min y 60 °C, reduciendo con rotaevaporador.

HAP	Extracciones				
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a
Naftaleno	93.2	3.7	2.0	0.0	0.0
Acenaftileno	93.1	6.9	0.0	0.0	0.0
Acenafteno	92.8	7.1	0.0	0.0	0.0
Fluoreno	96.7	3.2	0.0	0.0	0.0
Fenantreno	98.1	1.9	0.0	0.0	0.0
Antraceno	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Fluoranteno	94.1	5.9	0.0	0.0	0.0
Pireno	84.1	6.8	7.6	0.0	1.5
Benzo[a]antraceno	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Criseno	94.5	2.7	2.7	0.1	0.1
Benzo[b]fluoranteno	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Benzo[k]fluoranteno	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Benzo[a]pireno	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Indeno[1,2,3-cd]pireno	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Dibenzo[a,h]antraceno	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Benzo[ghi]perileno	98.9	0.0	0.0	0.0	0.8

5.1.2 Evaluación del efecto de la temperatura

Las temperaturas evaluadas fueron 40 °C y 60 °C, en la figura 30 se muestra el porcentaje de recuperación a ambas temperaturas, las barras de error corresponden al coeficiente de variación entre los fortificados de cada ensayo. A 60 °C las recuperaciones de 10 de los 16 HAP analizados fueron ligeramente mayores, pero menos precisas oscilando entre el 7.3 % (dibenzo[a,h]antraceno) y el 18.7 % (pireno). Se decidió continuar con las pruebas a ésta temperatura y modificar la técnica de concentración del extracto para reducir la manipulación de la muestra y evitar pérdidas de masa.

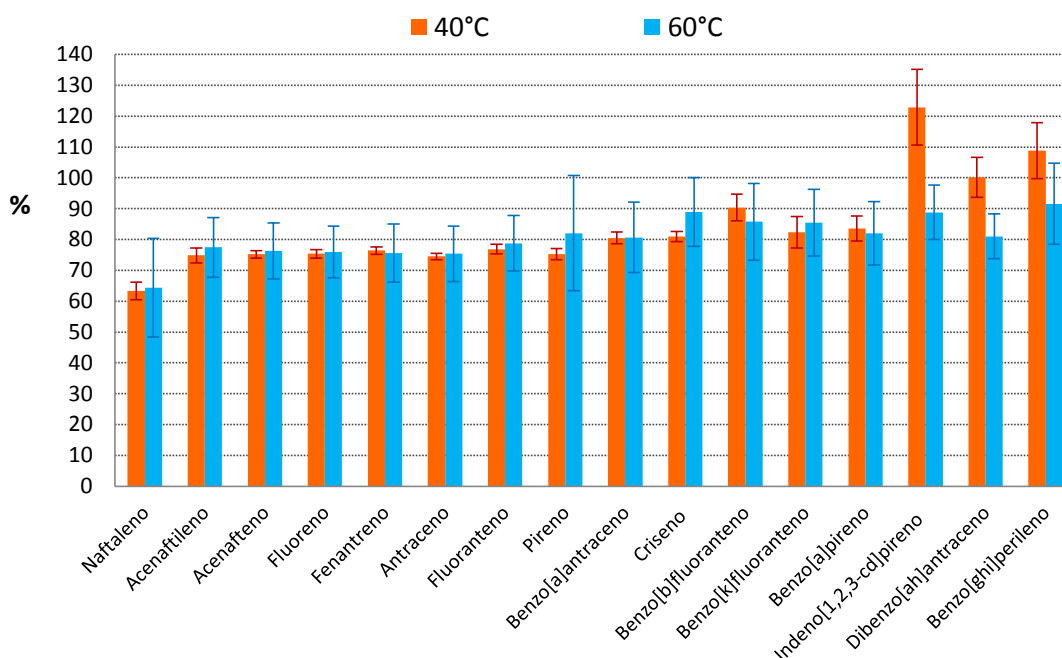


Figura 30. Porcentaje de recuperación a 40 °C y 60 °C. Ultrasonido, 5 min, 4 mL, 2 extracciones, sistema cerrado, reduciendo con rotaevaporador

5.1.3 Técnica de reducción

Con la técnica de reducción empleando flujo de nitrógeno se logró mejorar la recuperación de los HAP con pesos moleculares entre 152 y 202 g mol⁻¹. Aunque se mejoró en la extracción de los HAP más ligeros, no se incrementó la precisión entre los fortificados.

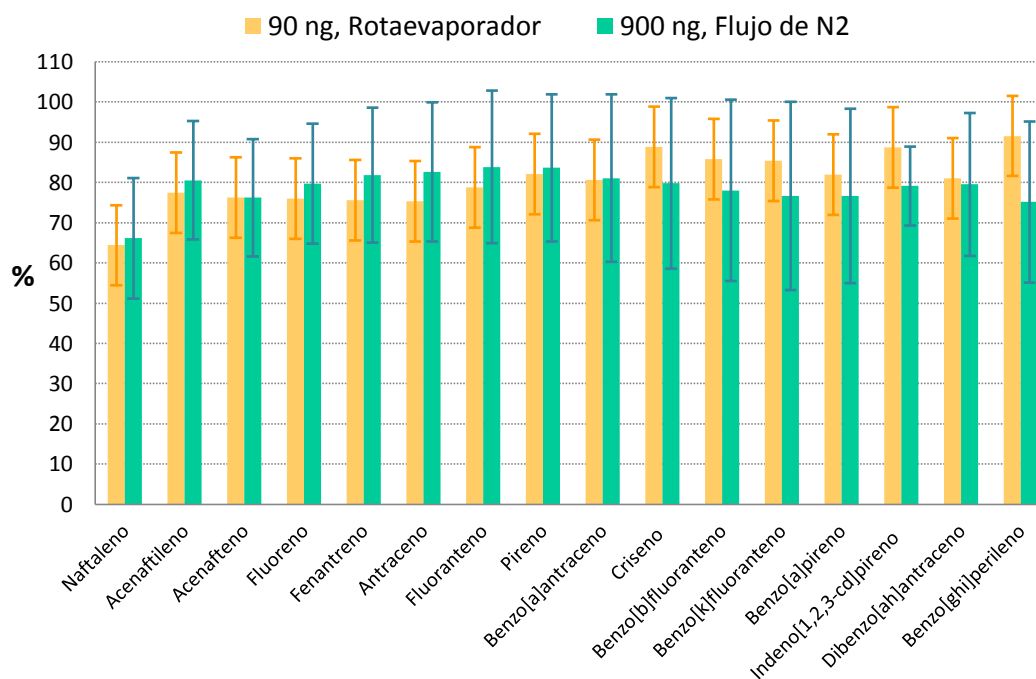


Figura 31. Recuperación de HAP utilizando diferentes técnicas de concentración del extracto las barras de error corresponden a los coeficientes de variación entre fortificados

Debido al ahorro de disolvente, de tiempo y a que se evita el trasvase en la reducción usando el rotaevaporador, se decidió usar el EDO-SIMD como técnica de reducción.

5.1.4 Sistema abierto y cerrado

Se observó que al utilizar el reflujo en el sistema abierto, la precisión del método mejoró de manera considerable pues los coeficientes de variación se encontraron en un intervalo del 1 al 5 % para éste ensayo. Además, la extracción fue más eficiente para los HAP con peso molecular $\geq 178 \text{ g mol}^{-1}$. El reflujo durante la extracción mejoró la eficiencia y la precisión en la extracción

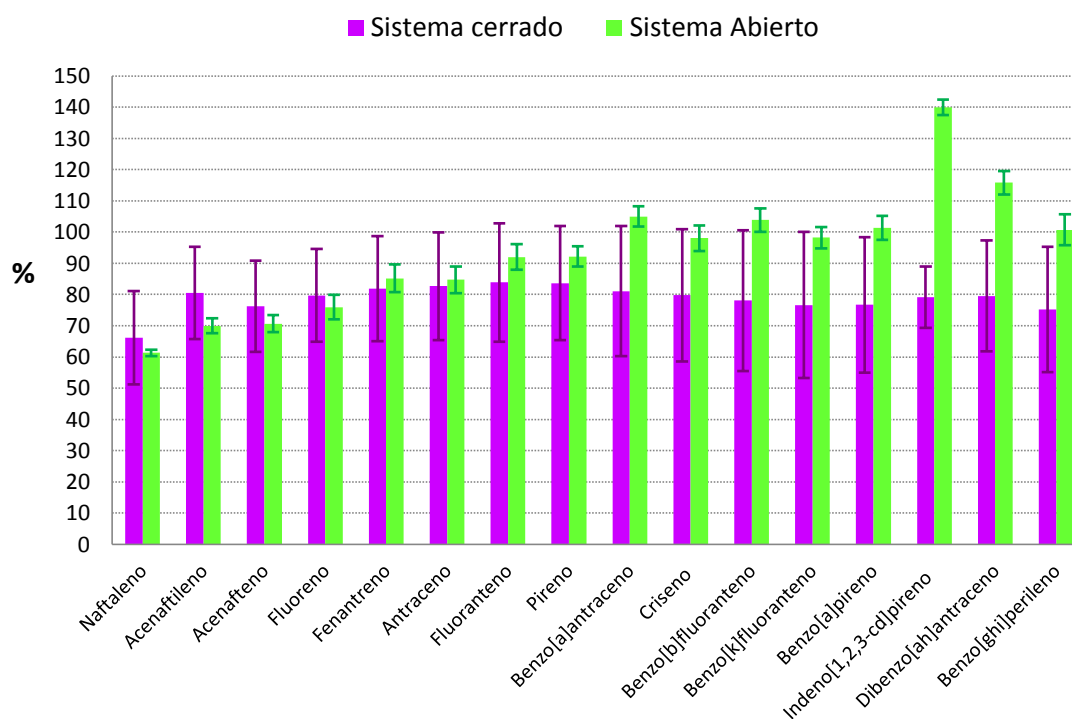


Figura 32. Recuperación de 16 HAP [900 ng mL^{-1}] extraídos usando la celda con tapón (sistema cerrado y acoplada a un condensador (sistema abierto). Las barras de error corresponden a los coeficientes de variación entre fortificados

Las condiciones de extracción finales fueron: 2 extracciones con 4 mL de cloruro de metileno a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ acoplado la celda a un condensador durante la extracción y reduciendo el extracto con flujo de N_2 .

5.2 Análisis cualitativo

Cada uno de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, sus homólogos deuterados y sus derivados metilados se identificaron por su espectro de masas y sus tiempos de retención relativos. En el apéndice A se encuentran algunos de los espectros de masas de los compuestos utilizados en la estandarización del método, la figura 33 ilustra el espectro de masas del fenantreno y la figura 34 el espectro de masas de su homólogo deuterado utilizado como su estándar interno.

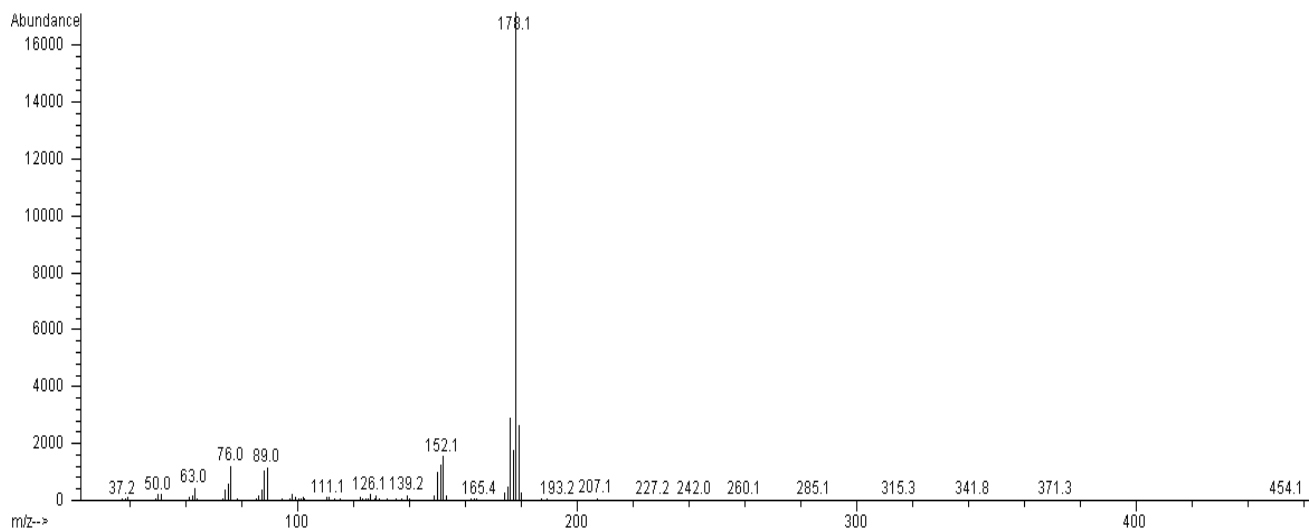


Figura 33. Espectro de masas del Fenantreno, peso molecular = 178 g mol^{-1} (espectro similar para Antraceno)

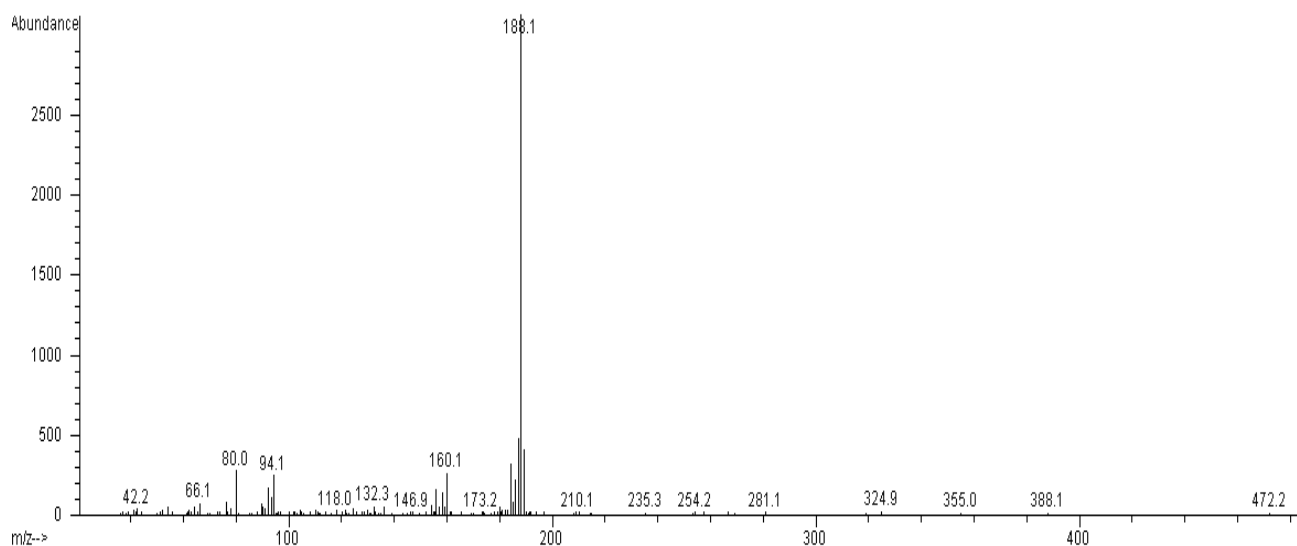


Figura 34. Espectro de masas del Fenantreno- d_{10} , peso molecular = 188 g mol^{-1} (espectro similar para Antraceno- d_{10})

Los compuestos que tienen el mismo peso molecular se inyectaron individualmente para conocer el orden en el que llegaban al detector y así asignarles los tiempos de retención a las señales correspondientes en el cromatograma de iones totales.

Se inyectó el nivel 1 de la curva instrumental en modo de barrido “scan” completo (35-500 uma) (figura 35) y posteriormente se ajustó el método para monitorear selectivamente a los iones “SIM”, delimitando los tiempos de cada ventana para cada grupo (5), así como los iones correspondientes a cada compuesto: M (Ion molecular), M+1 y M/2 (figura 36).

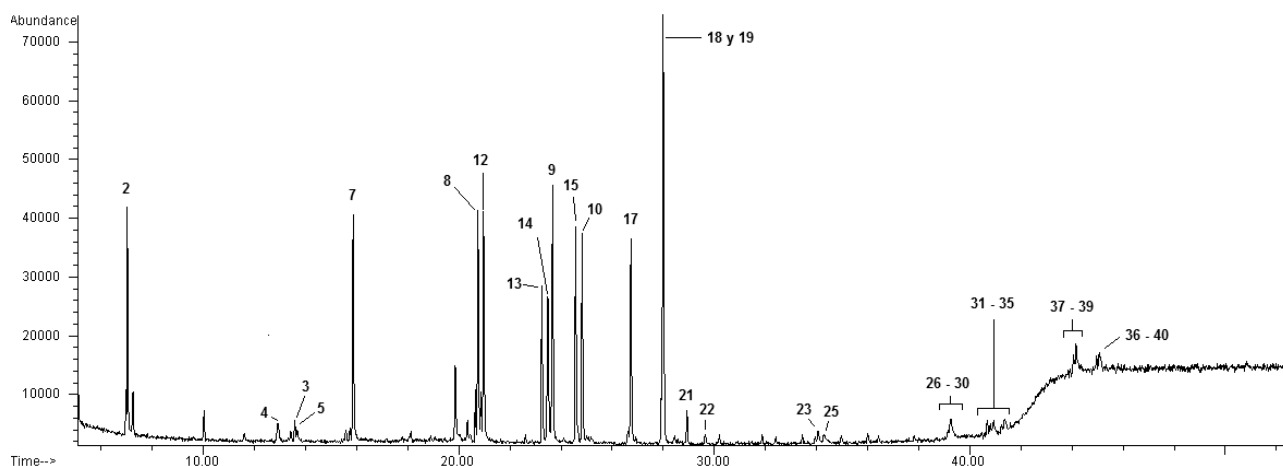


Figura 35. Cromatograma de iones totales del 1er nivel de la curva instrumental en barrido “SCAN” completo (35-500 uma). La numeración corresponde a la tabla XXIV

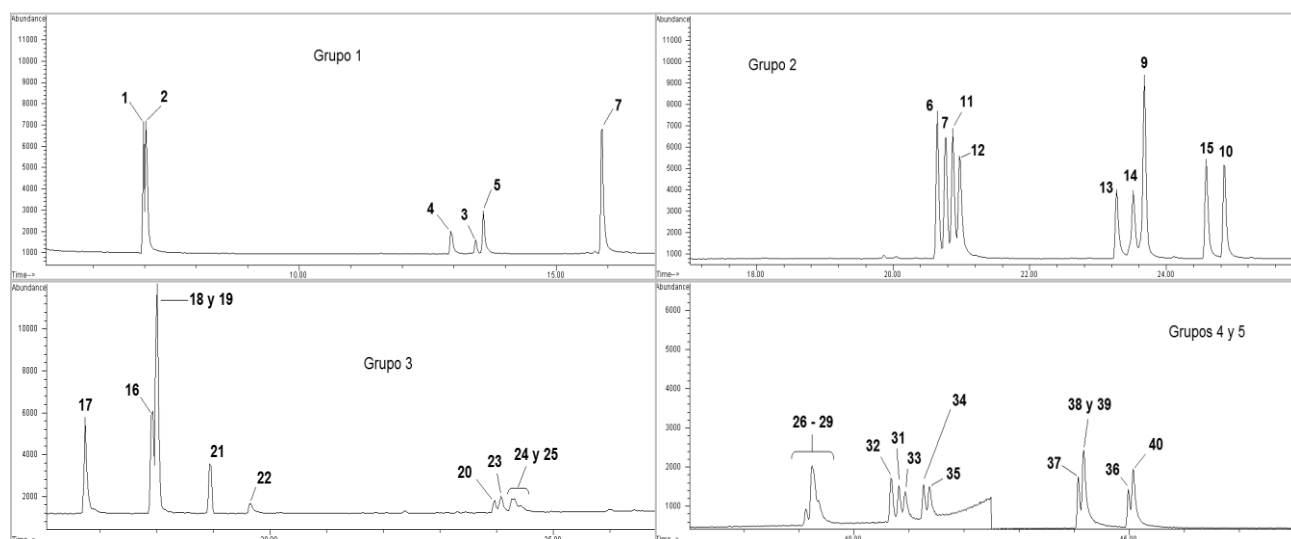


Figura 36. Cromatogramas de iones totales del nivel 5 de la curva instrumental por grupo en “SIM” La numeración corresponde a la tabla XXIV

Una vez con el método "SIM" ajustado, se inyectaron los blancos de método (figura 37), por duplicado, muestra no fortificada (figura 38) por duplicado, la curva de calibración de método (figuras 39) y las muestras (figura 40).por duplicado.

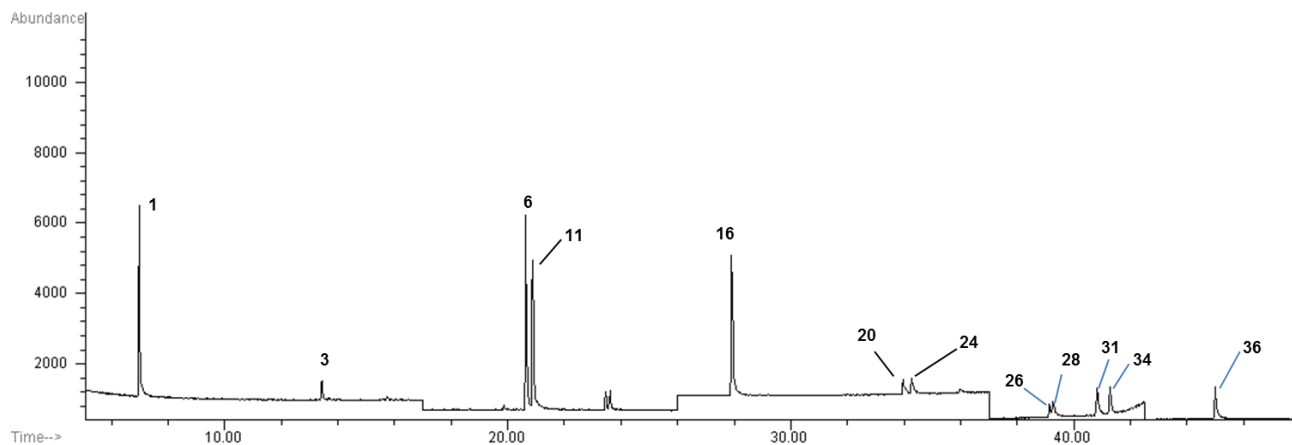


Figura 37. Cromatograma de los iones totales del blanco de método con estándar interno "SIM"
La numeración corresponde a la tabla XXIV

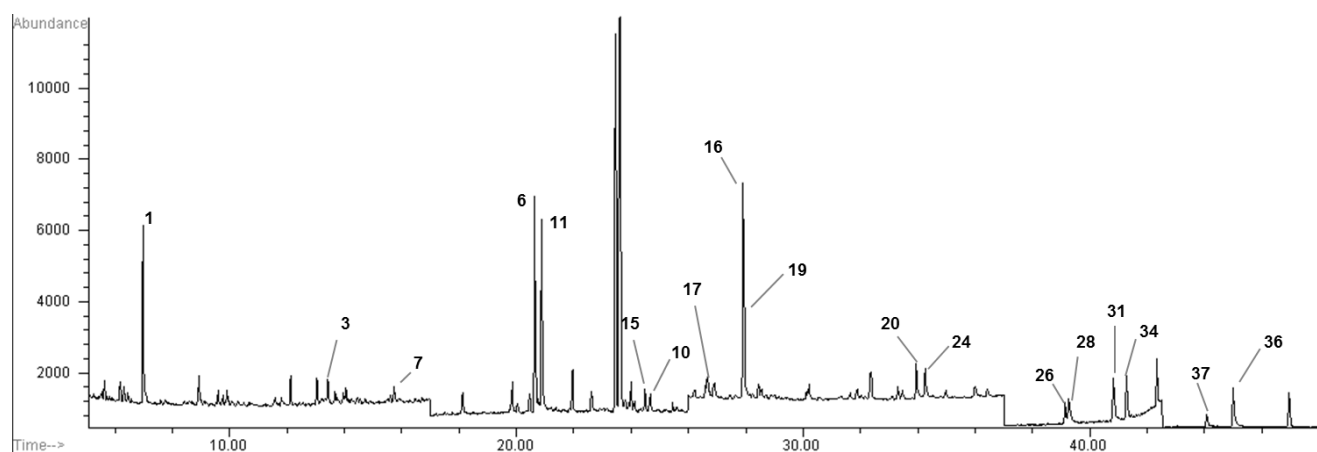


Figura 38 Cromatograma de iones totales del no fortificado del nivel 5 de la curva de método "SIM"
La numeración corresponde a la tabla XXIV

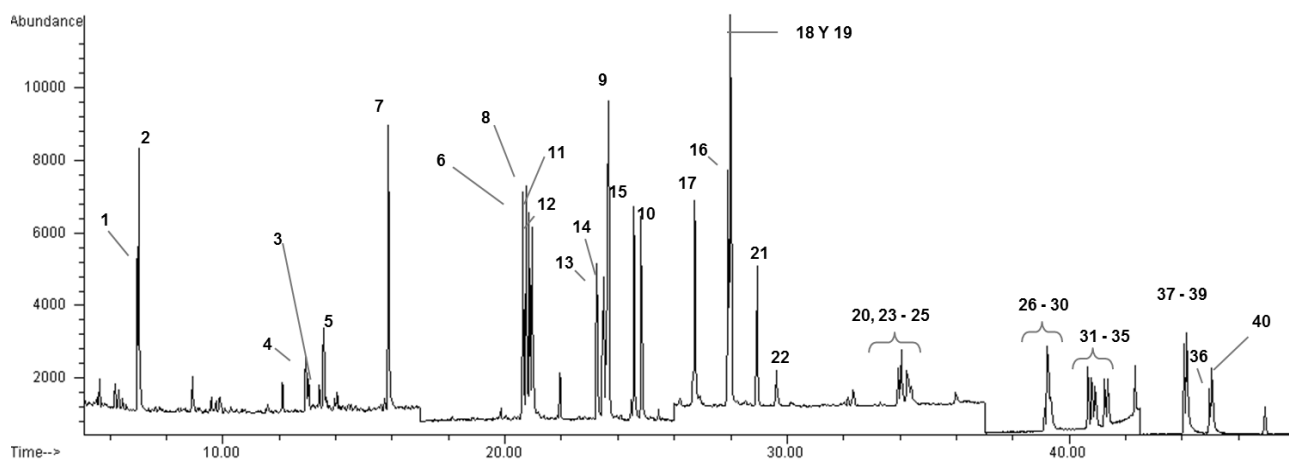


Figura 39. Cromatograma de iones totales del fortificado 1 del nivel 5 de la curva de método en "SIM"
La numeración corresponde a la tabla XXIV

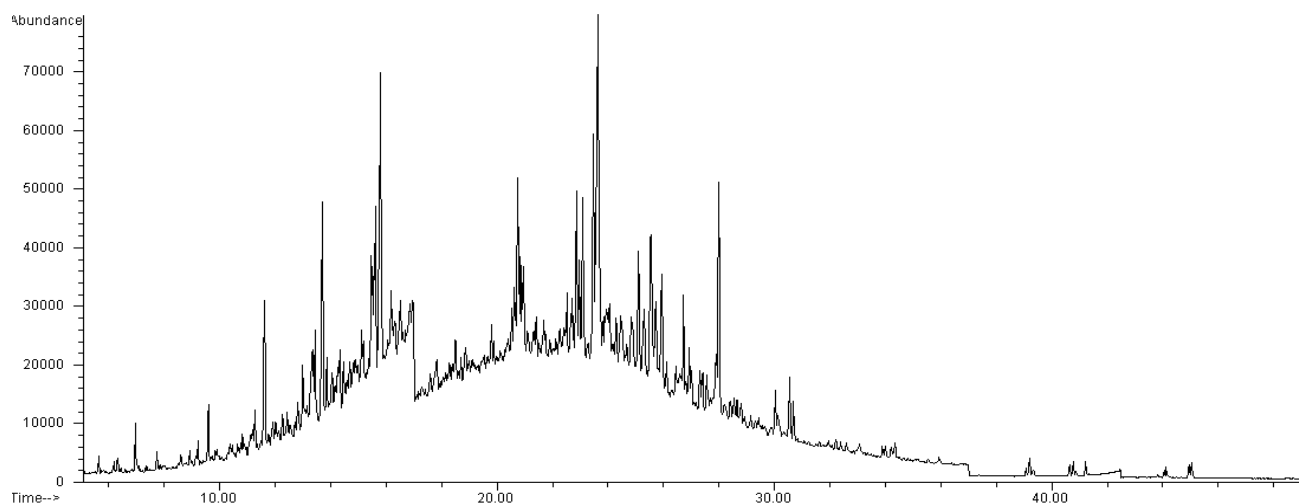


Figura 40. Cromatograma de iones totales del extracto orgánico de las partículas emitidas por la combustión de diesel a 1200 rpm (L7) en “SIM”

En la figura 41 se muestra la extracción de los iones 178 (fenantreno y antraceno), 188 (fenantreno- d_{10} y antraceno- d_{10}), 192 (HAP-metilados y ion secundario de HAP-dimetilados) y 206 (HAP-dimetilados) de la muestra L7. Al comparar los espectros de masas de las señales correspondientes a los iones 192 y 206 con los espectros de los HAP en la biblioteca del “software” no presentaron identificación positiva (“*matching*” < 80 %).

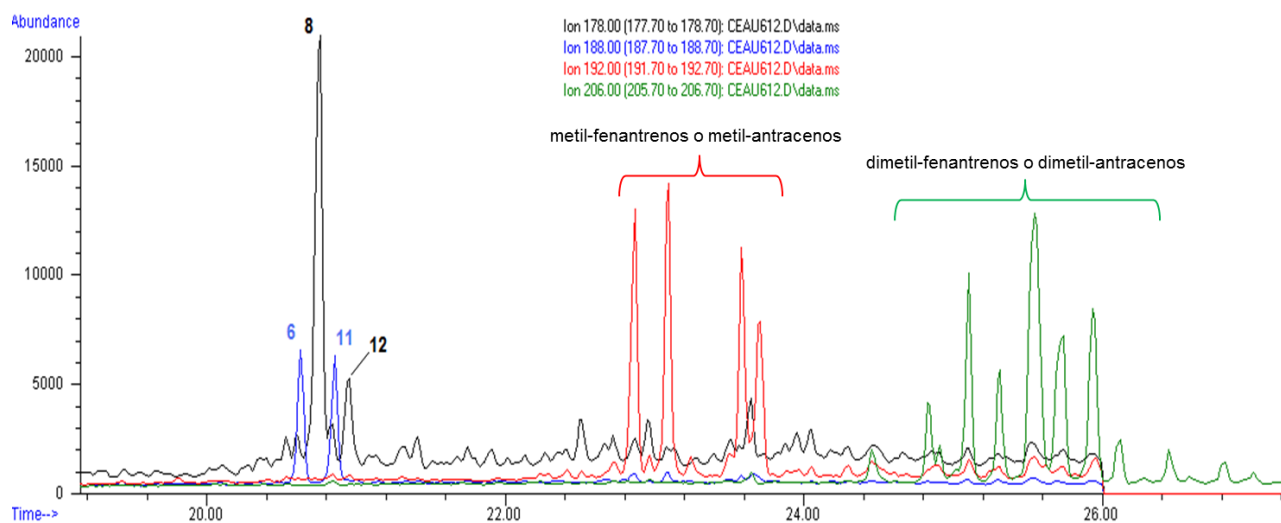


Figura 41. Iones extraídos (178, 188, 192 y 206) del cromatograma del extracto orgánico de las partículas emitidas por la combustión de diesel a 1200 rpm (L7) en “SIM”. Ver tabla XXIV para la identificación de los HAP

En las figuras 42 a 44 se muestra la extracción de los iones correspondientes a algunos de los HAP y cuantificados en esta muestra (L7).

Resultados y discusión

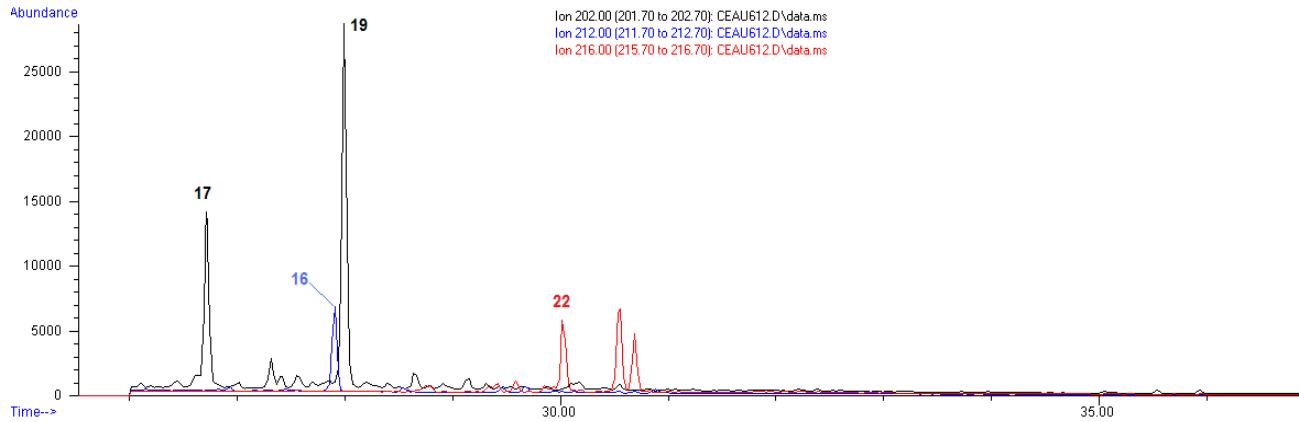


Figura 42. Iones extraídos (202, 212 y 216) del cromatograma del extracto orgánico de las partículas emitidas por la combustión de diesel a 1200 rpm (L7) en "SIM". Ver tabla XXIV para la identificación de los HAP

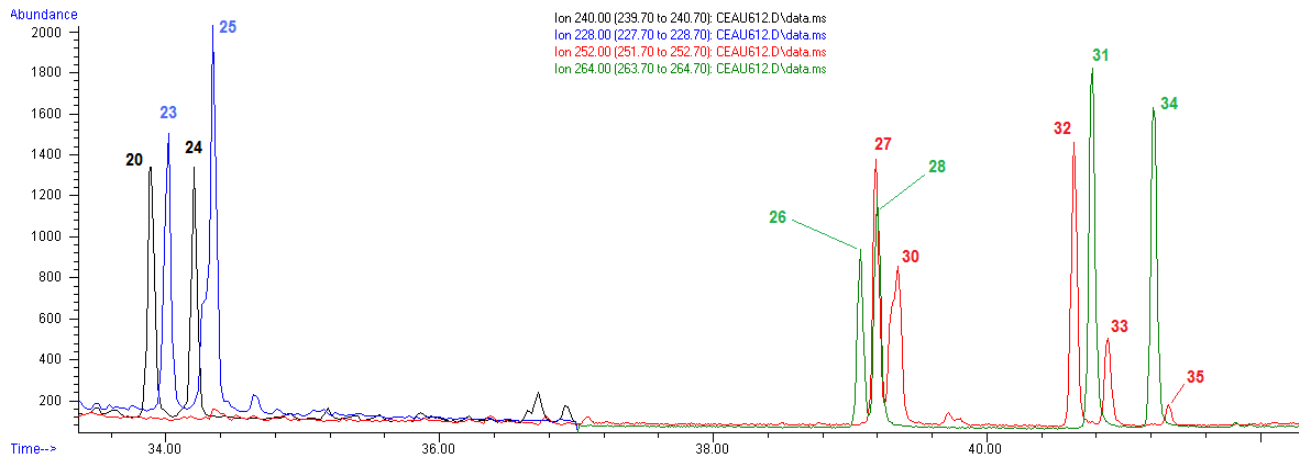


Figura 43. Iones extraídos (228, 240, 252 y 264) del cromatograma del extracto orgánico de las partículas emitidas por la combustión de diesel a 1200 rpm (L7) en "SIM". Ver tabla XXIV para la identificación de los HAP

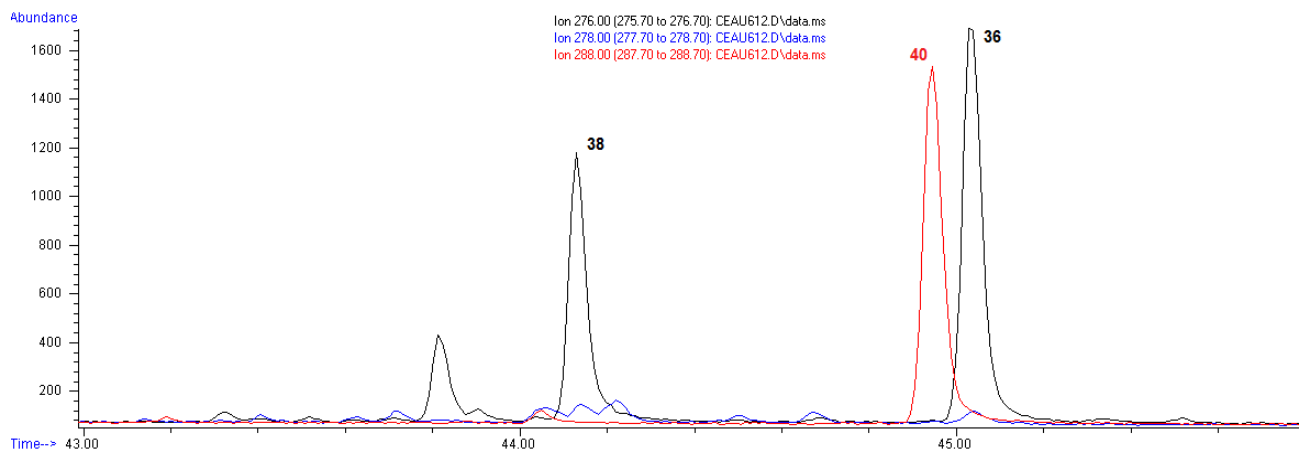


Figura 44. Iones extraídos (276, 278 y 288) del cromatograma del extracto orgánico de las partículas emitidas por la combustión de diesel a 1200 rpm (L7) en "SIM". Ver tabla XXIV para la identificación de los HAP

En la tabla XXIV se registran los iones utilizados para cuantificar cada compuesto, los tiempos de retención absolutos y los tiempos de retención relativos t_{rr} , en la última columna se muestra el intervalo de confianza calculado con la ecuación 28. El valor de t de tablas al 99 % de confianza es 2.403, s es la desviación estándar de las 54 inyecciones (n) de los fortificados tomadas en cuenta para determinar los t_{rr} .

$$IC = t_{rr} \pm t_{0.99} * (s/\sqrt{n}) \quad (\text{Ecuación 28})$$

Tabla XXIV. Iones (m/z), tiempos de retención absolutos y relativos de los HAP. N= 54

#	Compuesto	Ion cuantificado (ion base)(m/z)	Tiempo de retención absoluto [min]	Tiempo de retención relativo	Intervalo de confianza de t_{rr} al 99%
1	Naftaleno- d_8	136	6.97	1.00000	0.00000
2	Naftaleno	128	7.03	1.00834	0.00047
3	Acenafteno- d_{10}	164	13.41	1.00000	0.00000
4	Acenaftileno	152	12.94	0.96473	0.00037
5	Acenafteno	154	13.58	1.01243	0.00023
6	Fenantreno- d_{10}	188	20.63	1.00000	0.00000
7	Fluoreno	166	15.87	0.76939	0.00031
8	Fenantreno	178	20.75	1.00593	0.00018
9	4,5-Metilenfenantreno	190	23.67	1.14720	0.00020
10	3,6-Dimetilfenantreno	206	24.84	1.20393	0.00026
11	Antraceno- d_{10}	188	20.86	1.00000	0.00000
12	Antraceno	178	20.97	1.00504	0.00025
13	2-Metilantraceno	192	23.26	1.11501	0.00039
14	1-Metilantraceno	192	23.50	1.12643	0.00020
15	9-Metilantraceno	192	24.57	1.17784	0.00022
16	Pireno- d_{10}	212	27.91	1.00000	0.00000
17	Fluoranteno	202	26.73	0.95777	0.00020
18	9,10-Dimetilantraceno	206	27.99	1.00293	0.00007
19	Pireno	202	28.00	1.00322	0.00012
20	Benzo[a]antraceno- d_{12}	240	33.93	1.00000	0.00000
21	Triptíceno	228	28.93	0.85260	0.00011
22	Benzo[a]fluoreno	216	29.62	0.87287	0.00016
23	Benzo[a]antraceno	228	34.05	1.00351	0.00013
24	Criseno- d_{12}	240	34.24	1.00000	0.00000
25	Trifenileno+Criseno	228	34.31	1.00193	0.00013
26	Benzo[b]fluoranteno- d_{12}	264	39.11	1.00000	0.00000
27	Benzo[b]fluoranteno	252	39.22	1.00272	0.00006
28	Benzo[k]fluoranteno- d_{12}	264	39.23	1.00000	0.00000
29	7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno	256	39.28	1.00109	0.00009
30	Benzo[k]fluoranteno	252	39.34	1.00266	0.00008
31	Benzo[a]pireno- d_{12}	264	40.80	1.00000	0.00000
32	Benzo[e]pireno	252	40.67	0.99678	0.00007
33	Benzo[a]pireno	252	40.91	1.00285	0.00010
34	Perileno- d_{12}	264	41.25	1.00000	0.00000
35	Perileno	252	41.36	1.00263	0.00007
36	Benzo[ghi]perileno- d_{12}	288	44.97	1.00000	0.00000
37	Dibenzo[a,c]antraceno	278	44.07	0.97986	0.00007
38	Indeno[1,2,3-cd]pireno	276	44.16	0.98187	0.00012
39	Dibenzo[a,h]antraceno	278	44.17	0.98222	0.00015
40	Benzo[ghi]perileno	276	45.06	1.00198	0.00005

5.3 Análisis cuantitativo

Como se explicó en la sección 4.3.2 se obtuvo la masa de HAP en [ng] y de su correspondiente estándar interno para cada nivel de las curvas de calibración instrumentales y de método. En la figura 45 se muestra la gráfica de la curva de calibración instrumental para el fenantreno, compuesto que se encuentra en el “intervalo de concentraciones altas” y en la tabla XXV se encuentran las concentraciones de cada nivel (debido a que el aforo del extracto es 1 mL, estos valores equivalen a la masa total adicionada en ng), así como su concentración relativa (C_r) y el promedio de las áreas relativas (A_r) de las 3 inyecciones de cada nivel en el CG-EM.

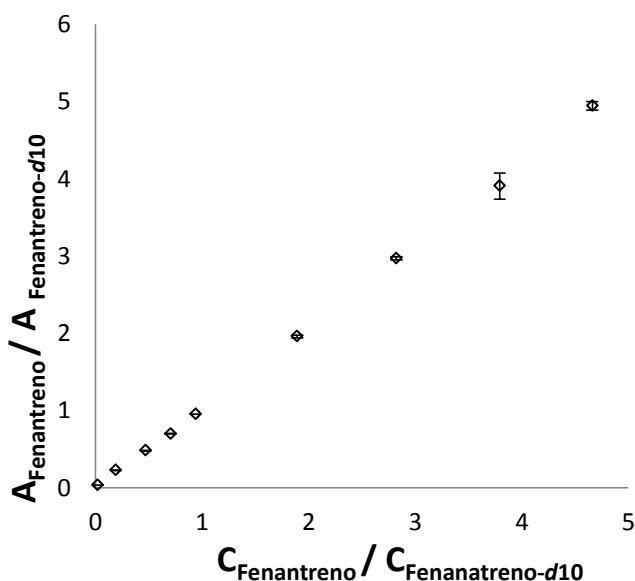


Figura 45. Curva de calibración instrumental del fenantreno

Tabla XXV. Curva de calibración instrumental del fenantreno.

Nivel	[ng mL ⁻¹]	C_r	A_r promedio
1	882.5	4.7	4.9403
2	718.2	3.8	3.9018
3	534.8	2.8	2.9651
4	358.6	1.9	1.9572
5	177.9	0.9	0.9492
6	133.3	0.7	0.6969
7	89.2	0.5	0.4793
8	36.2	0.2	0.2231
9	4.4	0.0	0.0312

Masa del fenantreno- d_{10} = 189.3 ng

Es importante mencionar que en el caso de los compuestos agrupados en el intervalo de concentraciones bajas, se cometió un error en la preparación de las disoluciones de fortificación (DF) de los niveles 3 y 4, el cual consistió en tomar las alícuotas de la disolución madre (DMB) en lugar de tomarlas de la disolución de trabajo (DTB1), dicho error incrementó la concentración de estos niveles por lo que se eliminaron de las curvas. Para ejemplificar lo anterior, la figura 46 y la tabla XXVI muestran la curva del acenaftileno ahora con 7 niveles de calibración después de haber eliminado los niveles 3 y 4.

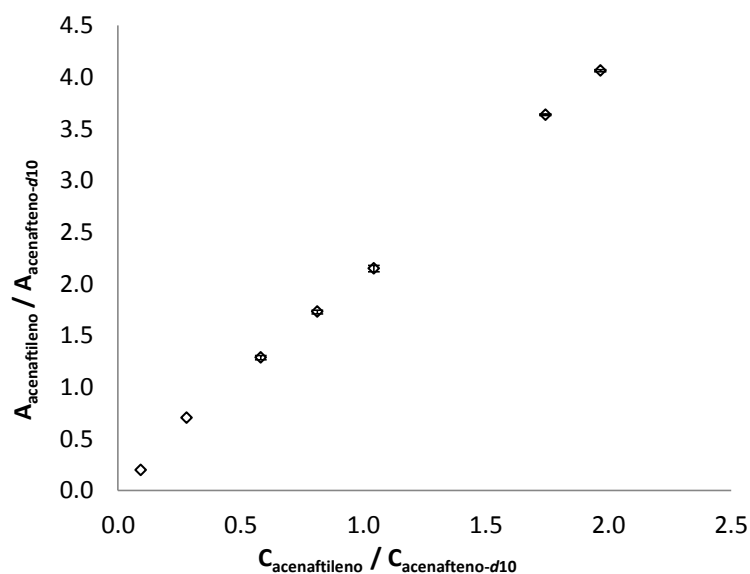


Figura 46. Curva de calibración instrumental del acenaftileno, se puede observar la eliminación de los niveles 3 y 4

Tabla XXVI. Curva de calibración instrumental del acenaftileno.

Nivel	[ng mL ⁻¹]	Cr	Ar promedio
1	882.5	4.7	4.9403
2	718.2	3.8	3.9018
5	177.9	0.9	0.9492
6	133.3	0.7	0.6969
7	89.2	0.5	0.4793
8	36.2	0.2	0.2231
9	4.4	0.0	0.0312

Masa del acenafteno-d₁₀ = 54.8 ng

En el apéndice C se encuentran los datos y las gráficas de las curvas de calibración instrumentales de algunos HAP y en el apéndice D se encuentran las curvas de calibración de método.

5.4 Intervalo lineal de trabajo y precisión

Para las curvas instrumentales se calculó el factor de respuesta relativo F_{rr} utilizando las áreas relativas A_r de las tres inyecciones de cada nivel y la concentración relativa del compuesto por nivel, posteriormente se calculó el promedio y el coeficiente de variación.

La tabla XXVII ejemplifica los cálculos para el fenantreno; en la columna del F_{rr} 1 se encuentra el resultado del cociente entre el área relativa de la primera inyección y la concentración relativa de cada nivel (ecuación 10), de la misma manera se obtuvieron las columnas F_{rr} 2 y F_{rr} 3 correspondientes a las otras dos inyecciones. En la última columna se muestran los coeficientes de variación **CV** de los F_{rr} de cada nivel ($CV_1 \dots CV_9$), que nos indican la precisión en cada nivel del análisis instrumental. La figura 47 muestra las áreas de las 3 inyecciones de la curva instrumental por nivel de concentración. La tabla XXVII muestra los CV a cada nivel y el CV involucrando todos los niveles, cuyo valor (10.4%) representa la precisión en todo el intervalo de calibración del análisis instrumental.

Resultados y discusión

Tabla XXVII. Concentraciones relativas (C_r), áreas relativas (A_r), factores de respuesta relativos (F_{rr}) y sus coeficientes de variación (CV) por nivel y entre niveles de la curva instrumental del fenantreno, masa del Fen- d_{10} = 189.3 ng.

Nivel	Fen [ng]	C_r	A_r Iny 1	A_r Iny 2	A_r Iny 3	A_r prom.	F_{rr} 1	F_{rr} 2	F_{rr} 3	CV %
1	882.5	4.7	4.9721	4.9721	4.8766	4.9403	1.0665	1.0665	1.0460	1.1
2	718.2	3.8	4.0054	3.9897	3.7101	3.9018	1.0557	1.0516	0.9779	4.3
3	534.8	2.8	2.9918	2.9524	2.9511	2.9651	1.0590	1.0451	1.0446	0.8
4	358.6	1.9	1.9398	1.9565	1.9752	1.9572	1.0240	1.0328	1.0426	0.9
5	177.9	0.9	0.9476	0.9487	0.9512	0.9492	1.0080	1.0092	1.0119	0.2
6	133.3	0.7	0.6949	0.6979	0.6977	0.6969	0.9868	0.9910	0.9908	0.2
7	89.2	0.5	0.4831	0.4787	0.4762	0.4793	1.0251	1.0159	1.0105	0.7
8	36.2	0.2	0.2254	0.2206	0.2232	0.2231	1.1782	1.1533	1.1668	1.1
9	4.4	0.0	0.0321	0.0312	0.0304	0.0312	1.3792	1.3422	1.3080	2.7
CV en toda la regresión =										10.4

La mayoría de los CV de los HAP fueron menores al 20 %, (valor que se propone como límite de variación en las curvas de calibración instrumentales < 2 μ g) por lo que ningún nivel se excluyó de la curva y además se cumple con el límite establecido por el método de referencia TO13A de la EPA (30 %). De esta forma el rango correspondiente al intervalo lineal de la curva instrumental para el fenantreno (ecuación 12) fue:

$$\text{Rango} = 882.5 \text{ ng} - 4.4 \text{ ng} = 878.1 \text{ ng de Fen}$$

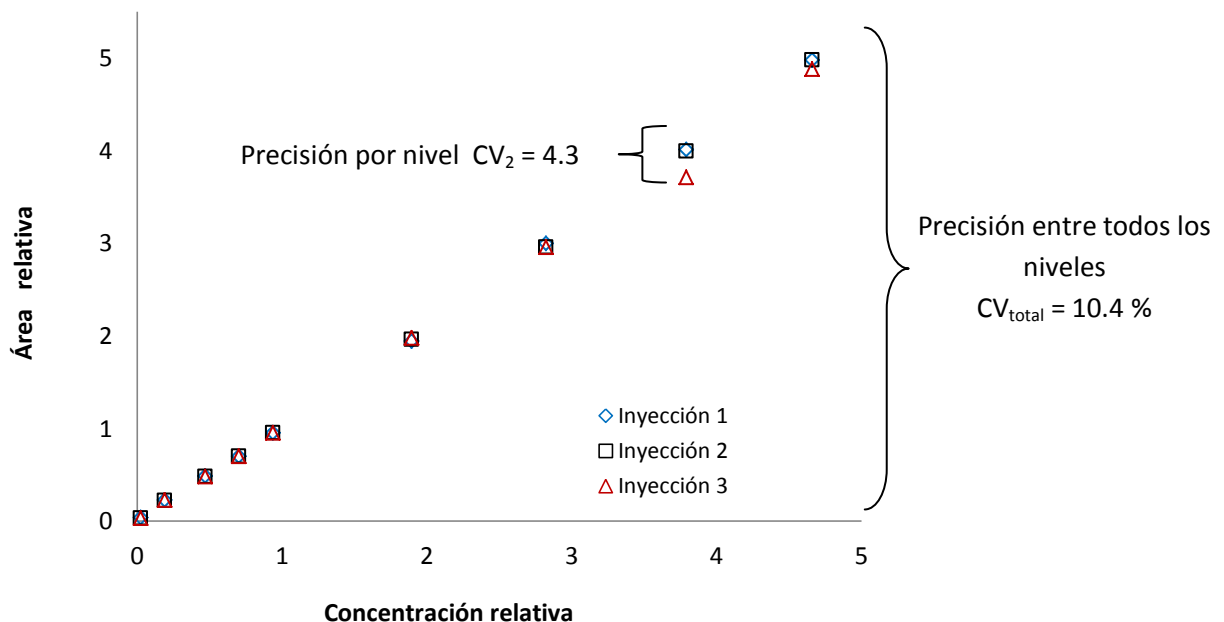


Figura 47. Precisión de los F_{rr} de la curva de calibración instrumental del fenantreno

Se realizó el mismo cálculo para las curvas de método pero utilizando como A_r el resultado de la diferencia entre las áreas relativas de cada fortificado y el área relativa del no fortificado del nivel correspondiente (ecuación 29). En la tabla XXVIII se ejemplifican estos cálculos, la diferencia fundamental consiste en que los coeficientes de variación de cada nivel indican la precisión del método evaluado en cada nivel de concentración, mientras que el coeficiente de variación considerando todos los niveles, indica la precisión total del método, para cada compuesto.

$$A_{r1} \text{ de la curva de método} = A_r \text{ del Fortificado 1} - A_r \text{ del No Fortificado} \quad (\text{Ecuación 29})$$

Tabla XXVIII. Concentraciones relativas (C_r), áreas relativas (A_r), factores de respuesta relativos (F_{rr}) y sus coeficientes de variación (CV) por nivel y entre niveles de la curva de calibración de método del fenantreno, masa del Fen- d_{10} = 189.3 ng.

Nivel	Fen [ng]	C_r	A_r F1-NF	A_r F2-NF	A_r F3-NF	A_r prom	F_{rr} 1	F_{rr} 2	F_{rr} 3	% CV
1	882.5	4.7	4.5806	4.0723	4.1545	4.4721	0.9825	0.8823	1.0129	7.1
2	718.2	3.8	2.9391	3.4477	3.4396	3.1706	0.7747	0.9076	0.8248	8.0
3	534.8	2.8	2.7084	2.9575	2.9724	2.8177	0.9587	1.0495	0.9840	4.7
4	358.6	1.9	1.4092	1.8206	1.8367	1.6907	0.7439	0.9653	0.9683	14.4
5	177.9	0.9	0.8960	1.0393	1.0153	1.0337	0.9532	1.0928	1.2529	13.6
6	133.3	0.7	0.6793	0.5771	0.5739	0.6597	0.9646	0.8172	1.0283	11.6
7	89.2	0.5	0.4118	0.3715	0.3749	0.3886	0.8738	0.7919	0.8080	5.3
8	36.2	0.2	0.1661	0.1432	0.1401	0.1622	0.8683	0.7403	0.9341	11.6
9	4.4	0.0	0.0246	0.0199	0.0174	0.0247	1.0605	0.8027	1.3187	24.3*
CV niveles 1 -8 =										10.2

En este caso el nivel 9 presentó un CV mayor al 20 % por lo que fue excluido de la curva, quedando el rango lineal de la curva de método para este compuesto en:

$$\text{Rango} = 882.5 \text{ ng} - 36.2 \text{ ng} = 846.3 \text{ ng de Fen}$$

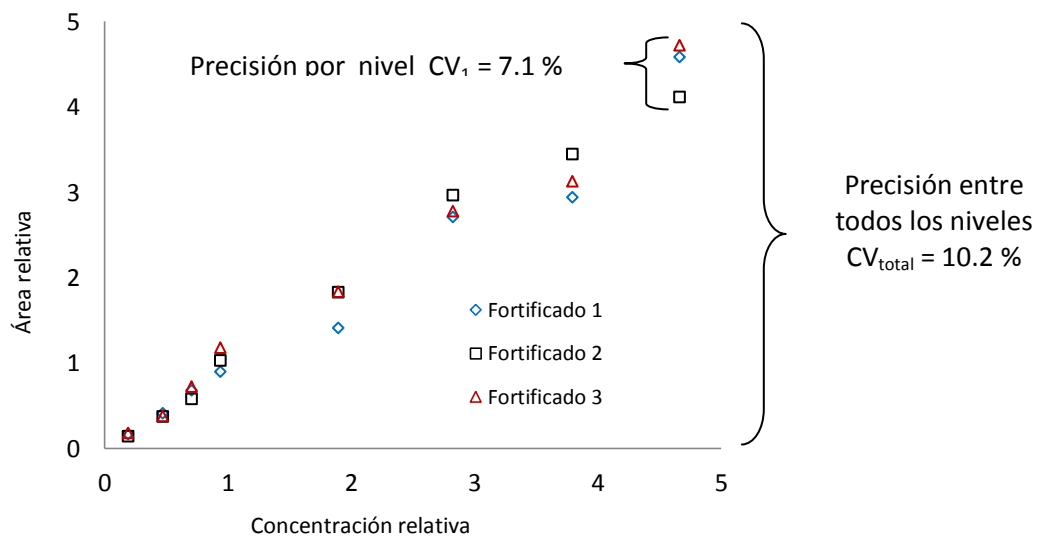


Figura 48. Precisión de los F_{rr} de la curva de calibración de método del fenantreno

Se observó en general, para todos los compuestos, que la precisión en términos de los coeficientes de variación del método fueron mayores a los instrumentales, esto debido a que en las curvas de método está incluida la variabilidad experimental de la extracción de los HAP entre réplicas (en este caso fortificados), mientras que en la curva instrumental sólo está involucrada la variabilidad del sistema cromatográfico y del espectrómetro de masas.

El apéndice E contiene las tablas de los resultados de la precisión evaluada por nivel y entre niveles del método para todos los compuestos. La tabla XXIX contiene los intervalos lineales de todos los HAP, acotados con base en el criterio de la exclusión de aquellos niveles cuyos CV > 20 %, es decir los nanogramos mínimos y máximos incluidos en las curvas instrumentales y de método.

Tabla XXIX. Intervalos lineales para las curvas instrumentales y de método.

HAP	Curva Instrumental			Curva Método		
	Mínimo	Máximo	Rango	Mínimo	Máximo	Rango
	[ng]	[ng]	[ng]	[ng]	[ng]	[ng]
Naftaleno	4.4	885.4	881.0	4.4	885.4	881.0
Acenaftileno	5.1	107.8	102.7	5.1	107.8	102.7
Acenafteno	5.2	108.6	103.4	5.2	108.6	103.4
Fluoreno	4.4	886.6	882.2	4.4	886.6	882.2
Fenantreno	4.4	882.5	878.1	36.2	882.5	846.3
4,5-Metilenfenantreno	4.5	899.3	894.8	4.5	899.3	894.8
3,6-Dimetilfenantreno	4.4	886.1	881.7	4.4	886.1	881.7
Antraceno	4.5	900.1	895.6	4.5	900.1	895.6
2-Metilantraceno	37.0	902.1	865.1	37.0	902.1	865.1
1-Metilantraceno	36.9	900.0	863.1	36.9	900.0	863.1
9-Metilantraceno	36.5	888.9	852.4	36.5	888.9	884.5
Fluoranteno	4.4	888.1	883.7	4.4	888.1	883.7
9,10-Dimetilantraceno	36.2	883.2	847.0	36.2	883.2	878.8
Pireno	4.4	891.1	886.7	4.4	891.1	886.7
Tripticeno	5.1	107.0	101.9	5.1	107.0	101.9
Benzo[a]fluoreno	4.6	97.9	93.3	4.6	97.9	93.3
Benzo[a]antraceno	4.9	103.6	98.7	4.9	103.6	98.7
Trifenileno+Criseno	4.1	87.5	83.4	4.1	87.5	83.4
Benzo[b]fluoranteno	4.6	96.7	92.1	4.6	96.7	92.1
7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno	4.7	100.0	95.3	4.7	100.0	95.3
Benzo[k]fluoranteno	4.8	101.1	96.3	4.8	101.1	96.3
Benzo[e]pireno	4.0	83.5	79.5	4.0	83.5	79.5
Benzo[a]pireno	4.3	91.6	87.3	4.3	91.6	87.3
Perileno	4.3	90.8	86.5	4.3	90.8	86.5
Dibenzo[a,c]antraceno	4.8	100.8	96.0	14.4	100.8	86.4
Indeno[1,2,3-cd]pireno	4.7	100.0	95.3	4.7	100.0	95.3
Dibenzo[a,h]antraceno	5.1	106.9	101.8	5.1	106.9	101.8
Benzo[ghi]perileno	4.9	102.8	97.9	4.9	102.8	97.9

5.5 Homocedasticidad

Se evaluó el comportamiento de las varianzas de las áreas relativas a lo largo de todo el intervalo de calibración como se explicó en el apartado 4.3.5.2. Para la curva instrumental se calculó la varianza con las 3 inyecciones de cada nivel y en el caso de la curva de método a partir de la varianza de las áreas relativas de los 3 fortificados corregidos por el no fortificado. Como ejemplo de cálculo se usaron los resultados del fenantreno (tabla XXX).

Tabla XXX. Concentraciones relativas, áreas relativas y varianzas por nivel de la curva instrumental del fenantreno.

Nivel	C _r	A _r Iny 1	A _r Iny 2	A _r Iny 3	Varianza, s ²
1	4.66	4.9721	4.9721	4.8766	0.0030428
2	3.79	4.0054	3.9897	3.7101	0.0275985
3	2.83	2.9918	2.9524	2.9511	0.0005348
4	1.89	1.9398	1.9565	1.9752	0.0003134
5	0.94	0.9476	0.9487	0.9512	0.0000034
6	0.70	0.6949	0.6979	0.6977	0.0000027
7	0.47	0.4831	0.4787	0.4762	0.0000120
8	0.19	0.2254	0.2206	0.2232	0.0000057
9	0.02	0.0321	0.0312	0.0304	0.0000007

Tomando las varianzas de los niveles 2 y 3 se calculó $F_{2/3}$ según la ecuación 13.

$$F_{2/3} = \frac{S_2^2}{S_3^2} = \frac{0.275985}{0.0005348} = 51.6$$

Los grados de libertad para ambas varianzas fueron igual a 2 (n-1), donde n es igual a las 3 inyecciones, el valor de F de tablas al 95 % de confianza (p = 0.05) fue **39**, por lo tanto. $F_{calculada}$ (en este caso $F_{2/3}$) fue mayor a F_{tablas} (51.6 > 39). Esto sugirió rechazar la hipótesis nula “las varianzas son iguales”, por lo que no existe homocedasticidad en al menos dos niveles del intervalo de calibración instrumental del fenantreno.

El mismo procedimiento se aplicó a las curvas instrumentales y de método para todos los HAP. La tabla XXXI muestra los resultados de la evaluación de la homocedasticidad. En la columna izquierda se indican los niveles cuyas varianzas fueron utilizadas para calcular $F_{a/b}$ siendo “a” el nivel con la varianza mayor y “b” el nivel con la varianza menor. Se observa que en el caso de las curvas de método, todos los compuestos tienen al menos una varianza diferente, lo que sugiere heterocedasticidad en el intervalo analizado y el uso de la regresión lineal ponderada.

Sin embargo, en el caso de las curvas instrumentales se encontraron 4 compuestos en los que no se encontró diferencia entre las varianzas, aun así se decidió utilizar la regresión ponderada.

Tabla XXXI. F de Fisher calculada para evaluar homocedasticidad. El valor de F ($p= 0.05$ de dos colas y $g.l.= 2$) es 39. Los valores en **negritas** y marcados * son los únicos menores a éste.

Compuesto	Curva instrumental		Curva de método	
	F _{a/b}	F _{calculada}	F _{a/b}	F _{calculada}
Naftaleno	F _{2/5}	306.3	F _{5/8}	82.0
Acenaftileno	F _{1/6}	42.0	F _{5/7}	50.0
Acenafteno	F _{2/6}	43.8	F _{5/6}	141.7
Fluoreno	F _{1/4}	106.5	F _{4/7}	44.0
Fenantreno	F _{3/6}	195.9	F _{4/7}	142.3
4,5-Metilenfenantreno	F _{1/8}	219.8	F _{5/8}	43.4
3,6-Dimetilfenantreno	F _{2/5}	136.8	F _{4/7}	405.0
Antraceno	F _{2/7}	692.9	F _{5/8}	69.0
2-Metilantraceno	F _{3/6}	99.3	F _{5/8}	69.2
1-Metilantraceno	F _{2/5}	55.8	F _{4/7}	263.7
9-Metilantraceno	F _{1/4}	52.5	F _{4/7}	108.6
Fluoranteno	F _{3/8}	142.6	F _{4/7}	84.8
9,10-Dimetilantraceno	F _{2/5}	187.8	F _{5/8}	80.2
Pireno	F _{2/7}	2013.5	F _{4/7}	72.3
Tripticeno	F _{2/5}	61.6	F _{6/7}	54.2
Benzo[a]fluoreno	F _{2/5}	63.8	F _{6/7}	98.5
Benzo[a]antraceno	F _{2/8}	66.1	F _{6/7}	885.8
Trifenileno+Criseno	F _{1/8}	53.9	F _{2/7}	59.1
Benzo[b]fluoranteno	F _{1/7}	89.3	F _{2/7}	97.6
7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno	F _{5/9}	7.7*	F _{5/7}	60.6
Benzo[k]fluoranteno	F _{1/9}	17.2*	F _{1/7}	46.6
Benzo[e]pireno	F _{1/9}	225.0	F _{2/7}	144.3
Benzo[a]pireno	F _{5/9}	26.4*	F _{6/7}	87.0
Perileno	F _{2/7}	44.1	F _{2/7}	251.6
Dibenzo[a,c]antraceno	F _{5/8}	84.8	F _{6/7}	124.1
Indeno[1,2,3-cd]pireno	F _{1/7}	64.3	F _{6/7}	41.9
Dibenzo[a,h]antraceno	F _{1/7}	229.0	F _{2/7}	93.3
Benzo[ghi]perileno	F _{1/7}	24.5*	F _{6/9}	13365.3

5.6 Regresión lineal ponderada

Se obtuvieron los parámetros de las curvas de calibración ponderadas como se describió en el apartado 4.3.5.3. Se utilizará la curva instrumental ponderada del fenantreno para ilustrar los cálculos: la segunda columna de la tabla XXXII, muestra las concentraciones relativas X_i de cada nivel de la curva, el área relativa promedio de las 3 inyecciones se encuentra representada en la columna Y_i , la desviación estándar y el inverso de la varianza se encuentran en las columnas S_i y $1/S_i^2$ respectivamente.

Una vez calculadas las varianzas se obtuvo el ponderador W_i según la ecuación 14, por último, las columnas $W_i X_i$, $W_i Y_i$, $W_i X_i Y_i$ y $W_i X_i^2$ se utilizaron en el cálculo de la pendiente ponderada b_w como lo indica la ecuación 15, en este ejemplo, ninguno de los niveles de concentración se excluyó para calcular la regresión ($n = 9$).

$$b_w = \frac{\sum_i w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2} = \frac{1.8981 - (9 \times 0.2735 \times 0.2812)}{1.8837 - (9 \times 0.2735^2)} = \mathbf{0.9962}$$

Tabla XXXII. Cálculo de los parámetros de la curva instrumental ponderada del fenantreno.

Nivel	x_i	y_i	S_i	$1/S_i^2$	w_i	$w_i x_i$	$w_i y_i$	$w_i x_i y_i$	$w_i x_i^2$
1	4.66	4.94	0.0552	328.7	328.7	0.0012	0.0058	0.0061	0.0286
2	3.79	3.92	0.1661	36.27	36.2	0.0001	0.0005	0.0005	0.0020
3	2.83	2.97	0.0231	1869.76	1869.8	0.0071	0.0200	0.0210	0.0593
4	1.89	1.96	0.0177	3191.08	3191.1	0.0121	0.0229	0.0236	0.0448
5	0.94	0.95	0.0019	290257.93	290257.9	1.0981	1.0322	1.0423	0.9798
6	0.70	0.70	0.0017	366245.07	366245.1	1.3856	0.9758	0.9655	0.6800
7	0.47	0.48	0.0035	83268.18	83268.2	0.3150	0.1485	0.1510	0.0712
8	0.19	0.22	0.0024	176549.50	176549.5	0.6679	0.1278	0.1490	0.0285
9	0.02	0.03	0.0008	1457210.44	1457210.4	5.5129	0.1281	0.1721	0.0040
Suma	15.51	16.14	0.2723	2378956.8	9.0	2.4616	2.5312	1.8981	1.8837
Prom.	1.72	1.79	0.0303	264328.5	1.0	0.2735	0.2812	0.2109	0.2093

Una vez obtenida la pendiente ponderada, la ordenada al origen se calculó con la ecuación 16.

$$a_w = \bar{y}_w - b_w \bar{x}_w = 0.2812 - (0.9962 \times 0.2735) = \mathbf{0.0088}$$

Por lo tanto el modelo de regresión lineal ponderada para la curva instrumental del fenantreno fue $A_r = 0.9962 C_r + 0.0088$.

Para evaluar el estadístico $S_{(y/x)_w}$ ponderado fue necesario calcular los valores de \hat{y} que es el valor predicho por la regresión para cada nivel (tabla XXXIII) según la ecuación 19.

$$S_{(y/x)_w} = \sqrt{\frac{\sum_i w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} = \sqrt{\frac{2.4616}{7}} = 0.01159$$

Resultados y discusión

Tabla XXXIII. Cálculo de la desviación de la regresión $S_{(y/x)w}$ de la curva instrumental del fenantreno.

Nivel	y_i	\hat{y}_i	$y_i - \hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$	$W_i(y_i - \hat{y}_i)^2$
1	4.9403	0.2873	0.082540	0.082540	0.0001026
2	3.9018	0.1135	0.012877	0.012877	0.0000018
3	2.9651	0.1421	0.020181	0.020181	0.0001428
4	1.9572	0.0612	0.003749	0.003749	0.0000453
5	0.9492	0.0040	0.000016	0.000016	0.0000172
6	0.6969	-0.0135	0.000182	0.000182	0.0002515
7	0.4793	0.0011	0.000001	0.000001	0.0000004
8	0.2231	0.0237	0.000563	0.000563	0.0003760
9	0.0312	-0.0007	0.000001	0.000001	0.0000029
Suma	16.1440	15.5253	0.618656	0.120110	0.0009404

En la tabla XXXIV se encuentran los parámetros b_w , a_w , $S_{(y/x)w}$ instrumentales y de método para todos los HAP analizados.

Tabla XXXIV. Pendientes b_w , ordenadas al origen a_w y desviaciones estándar $S_{(y/x)w}$ de las curvas instrumentales y de método de los HAP y sus derivados metilados.

Compuesto	Curva Instrumental			Curva Método		
	b_w	a_w	$S_{(y/x)w}$	b_w	a_w	$S_{(y/x)w}$
Naftaleno	1.2051	0.0175	0.01349	0.9923	0.0004	0.00247
Acenaftileno	1.9986	0.0875	0.03874	2.0403	0.0047	0.02858
Acenafteno	1.3445	0.1042	0.03953	1.1752	0.0237	0.01005
Fluoreno	0.6829	-0.0025	0.00547	0.6601	-0.0018	0.00480
Fenantreno	0.9962	0.0088	0.01159	0.9466	-0.0333	0.04377
4,5-Metilenfenantreno	0.6891	0.0061	0.01002	0.6338	0.0010	0.00297
3,6-Dimetilfenantreno	0.6073	-0.0051	0.01744	0.6012	0.0028	0.00656
Antraceno	1.1338	0.0025	0.01042	1.0524	0.0005	0.00808
2-Metilantraceno	0.5928	-0.0491	0.03094	0.5800	-0.0046	0.00663
1-Metilantraceno	0.5019	-0.0269	0.01105	0.4534	0.0009	0.00204
9-Metilantraceno	0.6904	-0.0071	0.02141	0.6831	-0.0406	0.02219
Fluoranteno	1.0925	0.0021	0.02586	0.9914	0.0068	0.00727
9,10-Dimetilantraceno	0.4566	0.1444	0.14748	0.5650	0.0633	0.11200
Pireno	1.3119	0.0043	0.01194	1.1512	0.0042	0.00457
Triptíceno	1.4421	0.0316	0.04755	1.0680	0.0058	0.00398
Benzo[a]fluoreno	1.1076	0.0375	0.01451	0.9998	0.0015	0.00534
Benzo[a]antraceno	1.4802	0.0119	0.02199	1.3501	-0.0030	0.00291
Trifenileno+Criseno	0.9894	0.0294	0.02233	0.9438	-0.0001	0.01546
Benzo[b]fluoranteno	2.5075	0.0065	0.06867	2.1765	0.0038	0.01133
7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno	0.5062	0.0738	0.03535	0.7159	0.0373	0.01763
Benzo[k]fluoranteno	1.2281	0.0578	0.05252	1.1939	0.0123	0.00700
Benzo[e]pireno	1.5817	0.0223	0.02229	1.3309	-0.0030	0.00301
Benzo[a]pireno	1.0772	0.0308	0.04265	1.0083	-0.0093	0.00265
Perileno	1.3039	0.0004	0.00436	1.1708	-0.0047	0.00522
Dibenzo[a,c]antraceno	0.9356	0.0087	0.01519	0.7801	-0.0478	0.07989
Indeno[1,2,3-cd]pireno	1.6301	0.0089	0.02979	1.5174	-0.0187	0.01083
Dibenzo[a,h]antraceno	1.1489	-0.0063	0.01178	1.0872	-0.0134	0.01677
Benzo[ghi]perileno	1.5519	0.0727	0.02586	1.4060	-0.0039	0.00244

5.7 Linealidad

El coeficiente de correlación de Pearson (r) se empleó como uno de los criterios para evaluar linealidad según la ecuación 20. La tabla XXXV ejemplifica el cálculo de éste en la curva instrumental del fenantreno.

Tabla XXXV. Cálculo del coeficiente de correlación r de la curva instrumental del fenantreno.

Nivel	$(x_i - \bar{x})$	$(y_i - \bar{y})$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})^2$
1	2.9154	4.2129	12.2823	8.4997	17.7483
2	2.0544	2.6862	5.5186	4.2206	7.2157
3	1.0933	1.2625	1.3803	1.1953	1.5939
4	0.1702	0.2472	0.0421	0.0290	0.0611
5	-0.7765	-1.0548	0.8190	0.6029	1.1126
6	-1.0104	-1.4043	1.4189	1.0208	1.9721
7	-1.2415	-1.6746	2.0789	1.5412	2.8042
8	-1.5191	-2.0214	3.0707	2.3078	4.0859
9	-1.6858	-2.2537	3.7994	2.8421	5.0793
Suma	0.0000	0.0000	30.4102	22.2594	41.6730

Sustituyendo los valores de la tabla en la ecuación tenemos:

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{\{\sum_i (x_i - \bar{x})^2\}[\sum_i (y_i - \bar{y})^2\}}} = \frac{30.4102}{\sqrt{22.2954 \times 41.6730}} = \mathbf{0.9985}$$

Se comprobó que r fuera significativo a 99 % de confianza mediante el cálculo del estadístico t , con $n - 2$ grados de libertad. Si $t_{\text{calculada}}$ era mayor que el valor en tablas entonces se rechaza la hipótesis nula "No existe correlación significativa".

$$t = \frac{|r| \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} = \frac{|0.9985| \times \sqrt{9-2}}{\sqrt{1-.9985^2}} = 47.77$$

Es importante mencionar que todos los compuestos tuvieron valores de $t_{\text{calculada}}$ mayores a los de tablas por lo que la correlación fue significativa a 99% de confianza.

La linealidad también se evaluó con el coeficiente de determinación r^2 , las curvas instrumentales tuvieron valores más cercanos a 1 en comparación con las curvas de método, sin embargo, todos los HAP excepto el 9,10-dimetilantraceno y el tripticeno presentaron valores de r^2 mayores a 0.95, es probable que para estos dos compuestos el modelo más adecuado no sea una recta y por eso sus coeficientes fueron menores.

La relación entre las áreas relativas y las concentraciones relativas fue lineal para los demás compuestos, esto concuerda con los coeficientes de variación menores a 20 % para cada nivel y entre niveles, demostrando que los factores de respuesta relativos, es decir, la pendiente, permanece constante en el intervalo de trabajo estudiado para esta matriz.

La tabla XXXVI contiene los valores de r , r^2 y t de todos los HAP para las curvas instrumentales y de método.

Tabla XXXVI. Coeficientes de correlación r evaluados con el estadístico t ($t_{0,99}$ y $n - 2$ g.l.) y coeficientes de determinación r^2 .

Compuesto	Curva Instrumental				Curva Método			
	r	r^2	$t_{calculada}$	t_{tablas}	r	r^2	$t_{calculada}$	t_{tablas}
Naftaleno	0.9998	0.9996	134.01	3.50	0.9958	0.9915	28.66	3.50
Acenaftileno	0.9995	0.9991	73.55	4.03	0.9866	0.9734	13.52	4.03
Acenafteno	0.9990	0.9981	51.11	4.03	0.9849	0.9700	12.72	4.03
Fluoreno	0.9995	0.9989	80.15	3.50	0.9939	0.9879	23.87	3.50
Fenantreno	0.9998	0.9995	122.06	3.50	0.9935	0.9871	21.44	3.71
4,5-Metilenfenantreno	0.9998	0.9996	132.84	3.50	0.9959	0.9919	29.28	3.50
3,6-Dimetilfenantreno	0.9991	0.9982	62.85	3.50	0.9959	0.9919	29.30	3.50
Antraceno	0.9997	0.9994	105.76	3.50	0.9960	0.9921	29.64	3.50
2-Metilantraceno	0.9988	0.9977	50.75	3.71	0.9971	0.9942	34.58	3.71
1-Metilantraceno	0.9999	0.9998	159.08	3.71	0.9968	0.9937	33.13	3.71
9-Metilantraceno	0.9986	0.9972	46.64	3.71	0.9971	0.9942	32.11	3.50
Fluoranteno	0.9994	0.9988	75.16	3.50	0.9969	0.9938	33.41	3.50
9,10-Dimetilantraceno	0.9737	0.9481	10.47	3.71	0.9637	0.9286	8.84	3.50
Pireno	0.9985	0.9969	47.77	3.50	0.9973	0.9946	35.76	3.50
Tripticeno	0.9690	0.9389	8.7	4.03	0.9838	0.9678	12.25	4.03
Benzo[a]fluoreno	0.9988	0.9976	45.35	4.03	0.9881	0.9764	14.38	4.03
Benzo[a]antraceno	0.9993	0.9987	61.69	4.03	0.9909	0.9819	16.45	4.03
Trifenileno+Criseno	0.9989	0.9977	46.65	4.03	0.9880	0.9762	14.33	4.03
Benzo[b]fluoranteno	0.9990	0.9981	51.12	4.03	0.9915	0.9831	17.07	4.03
7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno	0.9904	0.9809	16.04	4.03	0.9922	0.9846	17.85	4.03
Benzo[k]fluoranteno	0.9982	0.9963	36.88	4.03	0.9922	0.9844	17.77	4.03
Benzo[e]pireno	0.9992	0.9985	57.37	4.03	0.9920	0.9841	17.60	4.03
Benzo[a]pireno	0.9955	0.9911	23.54	4.03	0.9944	0.9889	21.07	4.03
Perileno	0.9993	0.9987	60.90	4.03	0.9936	0.9872	19.66	4.03
Dibenzo[a,c]antraceno	0.9993	0.9985	58.04	4.03	0.9889	0.9780	13.33	4.60
Indeno[1,2,3-cd]pireno	0.9991	0.9983	53.58	4.03	0.9952	0.9904	22.72	4.03
Dibenzo[a,h]antraceno	0.9964	0.9928	26.30	4.03	0.9942	0.9884	20.65	4.03
Benzo[ghi]perileno	0.9996	0.9992	77.93	4.03	0.9937	0.9875	19,85	4.03

Otra prueba estadística empleada para evaluar la linealidad del modelo fue a través del análisis de varianza (ANOVA), empleando el programa “*Statistica 8.0 Statsoft Inc.*” alimentado con las áreas relativas de cada inyección, en el caso de las curvas instrumentales y aquellas de cada fortificado, para las curvas de método, así como sus correspondientes concentraciones relativas. El “*software*” reporta la tabla de análisis de varianza (tabla XXI) como lo muestra la figura 49, en la ventana izquierda de la imagen se pueden observar los datos de la curva instrumental del fenantreno y en la ventana derecha la tabla de ANOVA.

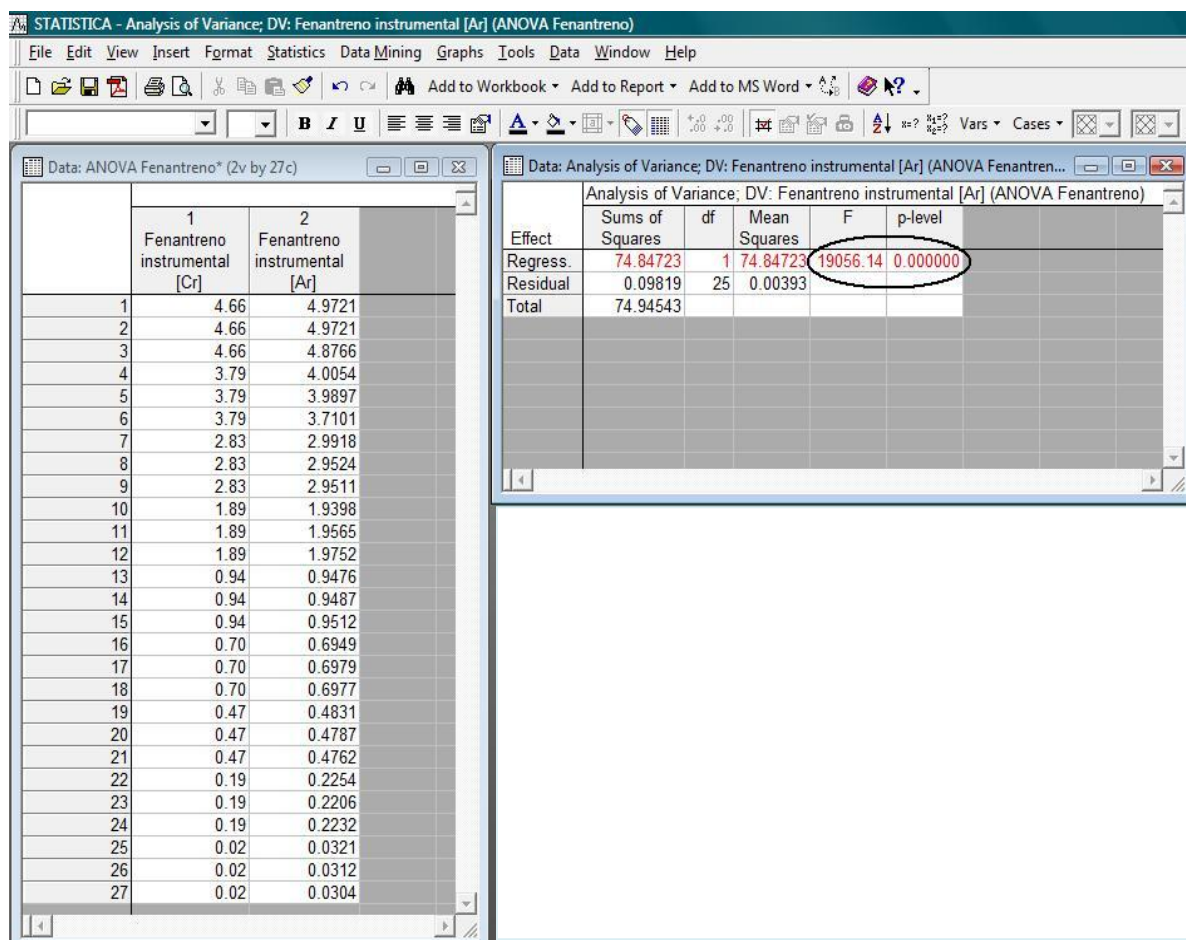


Figura 49. Imagen de la pantalla del análisis de varianza en *Statistica 8.0*. El círculo encierra los valores de $F_{calculada}$ y el valor de “p” que se encuentran en la tabla XXXVII

Se extrajeron los valores de $F_{calculada}$ (tabla XXXVII) de cada análisis y el valor de “p” en todas las curvas de calibración fue menor a 0.01, lo que indica el rechazo al 99 % de confianza de la hipótesis nula H_0 “El modelo no es lineal”.

Tabla XXXVII. $F_{\text{calculada}}$ para el análisis de varianza.

Compuesto	Curva instrumental	Curva de método
	$F_{\text{calculada}}$	$F_{\text{calculada}}$
Naftaleno	25525	1404
Acenaftileno	13345	481
Acenafteno	4822	403
Fluoreno	19684	1311
Fenantreno	19056	916
4,5-Metilenfenantreno	46460	1375
3,6-Dimetilfenantreno	10888	1378
Antraceno	26658	1461
2-Metilantraceno	9855	1649
1-Metilantraceno	24678	1435
9-Metilantraceno	6202	1223
Fluoranteno	17438	1680
9,10-Dimetilantraceno	391	267
Pireno	6850	2010
Tripticeno	284	371
Benzo[a]fluoreno	3525	464
Benzo[a]antraceno	9807	562
Trifenileno+Criseno	3466	516
Benzo[b]fluoranteno	7256	649
7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno	899	601
Benzo[k]fluoranteno	2718	610
Benzo[e]pireno	10848	626
Benzo[a]pireno	1995	735
Perileno	9413	719
Dibenzo[a,c]antraceno	10037	189
Indeno[1,2,3-cd]pireno	5815	802
Dibenzo[a,h]antraceno	798	667
Benzo[ghi]perileno	1378	725

El valor de $F_{\text{calculada}}$ está dado por el cociente de los cuadrados medios (tabla XXI), donde el numerador es una medida de la variabilidad explicada por la regresión, mientras que el denominador es debida al error. Los HAP con los valores menores de F fueron el 9,10-dimetilantraceno y el tripticeno, lo que concuerda con los valores menores de sus coeficientes de determinación.

5.8 Límites de detección y de cuantificación

Utilizando las desviaciones de la regresión $S_{(y/x)w}$ y las pendientes ponderadas b_w de cada compuesto, se calcularon los límites de detección y de cuantificación mediante las ecuaciones 26 y 27. Para ejemplificar, se seguirá tomando los datos de la curva instrumental para el fenantreno.

$$LD [\text{ng}] = [\text{ng de Est. Interno}] \times \frac{3 S_{(y/x)w}}{b_w} = [189.3 \text{ ng Fen} - d_{10}] \times \frac{3 \times 0.01159}{0.9962} = 6.6$$

$$LC [ng] = [ng \text{ de Est. Interno}] \times \frac{10 S_{(y/x)w}}{b_w} = [189.3 \text{ ng Fen} - d_{10}] \times \frac{10 \times 0.01159}{0.9962} = 22.0$$

La tabla XXXVIII muestra los límites de detección y de cuantificación ponderados para las curvas instrumentales y de método de cada HAP. En algunos HAP los valores mínimos de sus intervalos lineales (tabla XXIX) y en su mayoría los instrumentales se encuentran por debajo de sus límites de detección, sin embargo éstos niveles fueron usados en el cálculo de los mismos, debido a que los coeficientes de variación de los niveles de menor concentración fueron < 20 % y por ende se incluyeron en la regresión

Tabla XXXVIII. Límites de detección y de cuantificación ponderados instrumentales y de método.

Compuesto	Curva Instrumental		Curva de método	
	LD [ng]	LC[ng]	LDM [ng]	LCM [ng]
Naftaleno	6.2	20.7	1.4	4.6
Acenaftileno	3.2	10.6	2.3	7.7
Acenafteno	4.8	16.1	1.4	4.7
Fluoreno	4.6	15.1	4.1	13.8
Fenantreno*	6.6	22.0	26.3	87.5
4,5-Metilenfenantreno	8.3	27.5	2.7	8.9
3,6-Dimetilfenantreno	16.3	54.4	6.2	20.7
Antraceno	5.2	17.5	4.4	14.6
2-Metilantraceno	29.8	99.2	6.5	21.7
1-Metilantraceno	12.5	41.8	2.6	8.5
9-Metilantraceno*	17.7	58.9	18.5	61.7
Fluoranteno	13.7	45.6	4.2	14.1
9,10-Dimetilantraceno	186.7	622.4	114.6	382.0
Pireno	5.3	17.5	2.3	7.7
Tripticeno	6.0	20.0	0.7	2.3
Benzo[a]fluoreno	2.4	8.0	1.0	3.2
Benzo[a]antraceno	2.7	9.0	0.4	1.3
Trifenileno+Criseno	2.5	8.3	1.8	6.0
Benzo[b]fluoranteno	3.7	12.5	0.7	2.4
7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno	11.9	39.6	4.2	14.0
Benzo[k]fluoranteno	7.3	24.2	1.0	3.3
Benzo[e]pireno	2.4	8.0	0.4	1.3
Benzo[a]pireno	6.8	22.6	0.5	1.5
Perileno*	0.6	1.9	0.8	2.5
Dibenzo[a,c]antraceno*	2.8	9.2	17.5	58.2
Indeno[1,2,3-cd]pireno	3.1	10.4	1.2	4.1
Dibenzo[a,h]antraceno*	1.7	5.8	2.6	8.8
Benzo[ghi]perileno	2.8	9.5	0.3	1.0

Se observa que los compuestos marcados con un asterisco (*) presentan límites de detección y de cuantificación de método mayores a los instrumentales, mientras que para el resto de los HAP ocurre lo contrario. Para explicar este comportamiento y debido a que el

cálculo de los límites depende de las pendientes ponderadas b_w y de las desviaciones de la regresión $S_{(y/x)w}$ (ecuación 26 y 27), se evaluó la diferencia entre las pendientes de las curvas de calibración instrumentales y las de método mediante el estadístico t de *Student*, mientras que la diferencia entre las desviaciones se evaluó usando la prueba F de Fisher.

La tabla XXXIX muestra los valores de t calculados según la ecuación 30 para la comparación de las pendientes (Steel y Torrie 1995).

$$t = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\left(\frac{S_e}{S_{xx}}\right)_1 + \left(\frac{S_e}{S_{xx}}\right)_2}} \quad (\text{Ecuación 30})$$

Donde m_1 es la pendiente ponderada b_w de la curva de calibración instrumental
 m_2 es la pendiente ponderada b_w de la curva de calibración de método

$$S_e = \sqrt{\frac{S_{yy} - (S_{xy})^2 / S_{xx}}{n - 2}} \quad (\text{Ecuación 31})$$

$$S_{xx} = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \quad (\text{Ecuación 32})$$

$$S_{xy} = \sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n} \quad (\text{Ecuación 33})$$

$$S_{yy} = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \quad (\text{Ecuación 34})$$

Los grados de libertad de t están dados por $n_1 + n_2 - 4$, n_1 corresponde al número de datos de la curva instrumental y n_2 a los de la curva de método. La hipótesis nula H_0 es “las pendientes son iguales” y la hipótesis alterna H_a “las pendientes son diferentes”, si $t_{calculada}$ fue mayor a t de tablas se rechazó la hipótesis nula.

Tabla XXXIX. Comparación de pendientes usando t de student al 95% de confianza ($p = 0.05$).

Compuesto	$g.l = n_1 + n_2 - 4$	$t_{calculada}$	$t_{0.95}$ de tablas
Naftaleno	50	3.35	2.01
Acenaftileno	38	0.21	2.02
Acenafteno	38	1.06	2.02
Fluoreno	50	0.43	2.01
Fenantreno	47	0.71	2.01
4,5-Metilenfenantreno	50	1.12	2.01
3,6-Dimetilfenantreno	50	0.12	2.01
Antraceno	50	1.8	2.01
2-Metilantraceno	47	0.25	2.01
1-Metilantraceno	47	1.13	2.01
9-Metilantraceno	44	0.12	2.02
Fluoranteno	50	1.58	2.01
9,10-Dimetilantraceno	44	1.07	2.02
Pireno	50	2.22	2.01
Tripticeno	37	1.61	2.03
Benzo[a]fluoreno	37	0.67	2.03
Benzo[a]antraceno	37	0.80	2.03
Trifenileno+Criseno	38	0.37	2.02
Benzo[b]fluoranteno	38	1.78	2.02
7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno	38	1.62	2.02
Benzo[k]fluoranteno	38	0.21	2.02
Benzo[e]pireno	38	1.45	2.02
Benzo[a]pireno	38	0.43	2.02
Perileno	38	0.87	2.02
Dibenzo[a,c]antraceno	35	0.74	2.03
Indeno[1,2,3-cd]pireno	38	0.66	2.02
Dibenzo[a,h]antraceno	38	0.36	2.02
Benzo[ghi]perileno	38	0.93	2.02

Los compuestos con pendientes significativamente diferentes fueron naftaleno y pireno, siendo la pendiente mayor en las curvas instrumentales para ambos HAP.

Por otra parte, la diferencia entre las desviaciones de las regresiones lineales ponderadas de las curvas de calibración instrumentales y las de método se evaluó mediante el estadístico “F de Fisher”. La hipótesis nula H_0 “las varianzas son iguales” fue rechazada si el valor de F calculada por la ecuación 13 fue mayor al valor de F reportado en tablas para $n - 1$ grados de libertad, donde n fue igual al número de niveles en la curvas de calibración, la hipótesis alterna fue H_a “las varianzas son diferentes”.

Tabla XL. F de Fisher calculada para la comparación de las varianzas $S_{(y/x)w}$ ponderadas, (g.l.= n-1 y p = 0.05).

HAP	$F_{\text{calculada}}$	$F_{0.95}$ de tablas	Si $F_{\text{calculada}} > F_{\text{tablas}}$ Se rechaza H_0
Naftaleno	29.828	3.438	Varianzas diferentes
Acenaftileno	1.837	4.284	Varianzas iguales
Acenafteno	15.471	4.284	Varianzas diferentes
Fluoreno	1.299	3.438	Varianzas iguales
Fenantreno *	14.262	3.438	Varianzas diferentes
4,5-Metilenfenantreno	11.382	3.438	Varianzas diferentes
3,6-Dimetilfenantreno	7.052	3.438	Varianzas diferentes
Antraceno	1.663	3.438	Varianzas iguales
2-Metilantraceno	21.778	3.500	Varianzas diferentes
1-Metilantraceno	29.340	3.500	Varianzas diferentes
9-Metilantraceno *	1.074	3.787	Varianzas iguales
Fluoranteno	12.653	3.438	Varianzas diferentes
9,10-Dimetilantraceno	1.734	4.787	Varianzas diferentes
Pireno	3.166	4.284	Varianzas diferentes
Tripticeno	142.736	4.284	Varianzas diferentes
Benzo[a]fluoreno	7.383	4.284	Varianzas diferentes
Benzo[a]antraceno	57.104	4.284	Varianzas diferentes
Trifenileno+Criseno	2.086	4.284	Varianzas iguales
Benzo[b]fluoranteno	36.735	4.284	Varianzas diferentes
7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno	4.020	4.284	Varianzas iguales
Benzo[k]fluoranteno	56.293	4.284	Varianzas diferentes
Benzo[e]pireno	54.839	4.284	Varianzas diferentes
Benzo[a]pireno	259.028	4.284	Varianzas diferentes
Perileno *	1.433	4.284	Varianzas iguales
Dibenzo[a,c]antraceno *	27.661	4.284	Varianzas diferentes
Indeno[1,2,3-cd]pireno	7.566	4.284	Varianzas diferentes
Dibenzo[a,h]antraceno *	2.027	4.284	Varianzas iguales
Benzo[ghi]perileno	112.325	4.284	Varianzas diferentes

En los compuestos marcados con asterisco (*) la varianza $S_{a(y/x)w}^2$ en el numerador fue la correspondiente a la desviación de la regresión de la curva de calibración de método. Estos HAP coinciden con aquellos cuyos límites de detección y de cuantificación de método fueron numéricamente superiores a los instrumentales (tabla XXXVIII).

De los 29 HAP analizados, las varianzas de la regresión de las curvas de calibración de método fueron significativamente mayores para 2 de ellos, para 8 de ellos las varianzas entre las curvas de calibración de método y las instrumentales no fueron significativamente

diferentes, mientras que para los 19 restantes las varianzas de la regresión fueron mayores en la curva de calibración instrumental. Este comportamiento fue independiente al peso molecular del HAP, a la concentración de cada curva de calibración y a las pendientes.

La figura 50 ilustra un ejemplo donde la varianza de la curva de calibración del método para el fenantreno fue mayor a la instrumental. Se observa que al no haber diferencia estadísticamente significativa entre las pendientes, ambos límites de método fueron numéricamente mayores a los instrumentales, debido a la mayor varianza observada en la regresión de la curva de método.

$$LD \propto \frac{3 S_{(y/x)w}}{b_w}$$

$$LC \propto \frac{10 S_{(y/x)w}}{b_w}$$

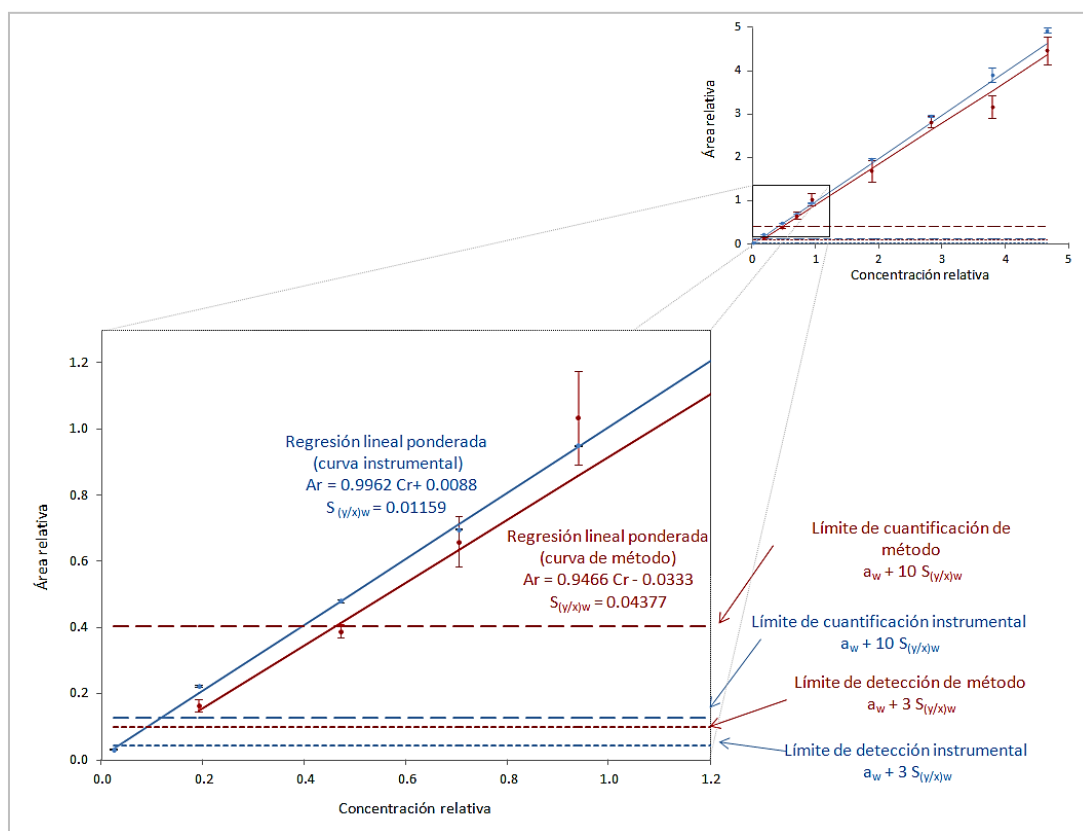


Figura 50. Regresiones lineales ponderadas de las curvas instrumental y de método del fenantreno y sus límites de detección y de cuantificación (líneas punteadas)

La figura 50 ilustra el efecto de $S_{(y/x)w}$ sobre los límites de detección y cuantificación para los HAP marcados con asterisco (*) en la tabla XL y en los que no se encontró diferencia significativa en las pendientes.

Para 19 de los 29 HAP (tabla XL), la varianza mayor $S_{a(y/x)w}^2$ fue la correspondiente a la desviación de la regresión de la curva de calibración instrumental, estos compuestos coinciden con aquellos HAP con límites de detección y cuantificación instrumentales numéricamente superiores a los de método (tabla XXXVIII). Para la mayoría de estos compuestos no se observó diferencia significativa entre las pendientes instrumentales y del método (excepto pireno y naftaleno), por lo que los valores de los límites de detección y de cuantificación instrumentales fueron mayores que los de método debido a la mayor desviación de la regresión en las primeras (figura 51).

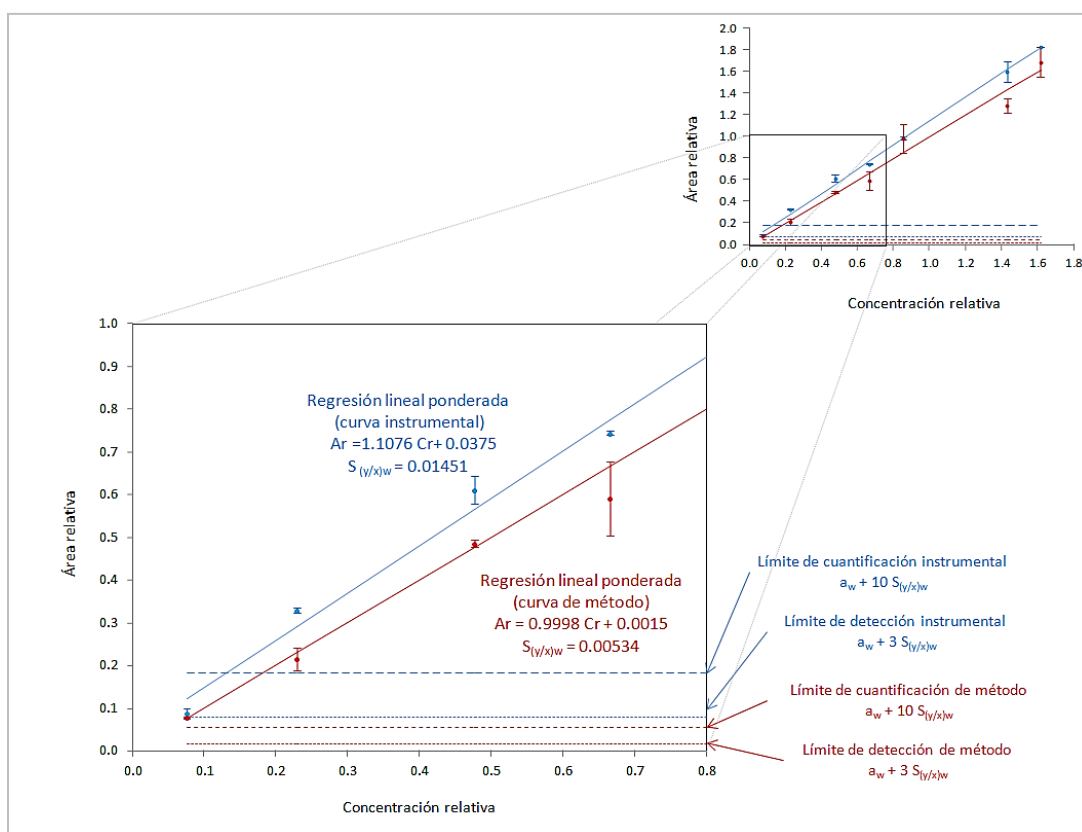


Figura 51. Regresiones lineales ponderadas de las curvas instrumental y de método del benzo[a]fluoreno y sus límites de detección y de cuantificación (líneas punteadas)

En el caso del pireno y del naftaleno las pendientes y las desviaciones de la regresión de las curvas instrumentales fueron significativamente mayores a las de método. A pesar de la diferencia entre pendientes, los límites de detección y de cuantificación instrumentales fueron superiores a los límites del método, sugiriendo que las desviaciones de la regresión tienen mayor efecto sobre los límites que las pendientes (figura 52).

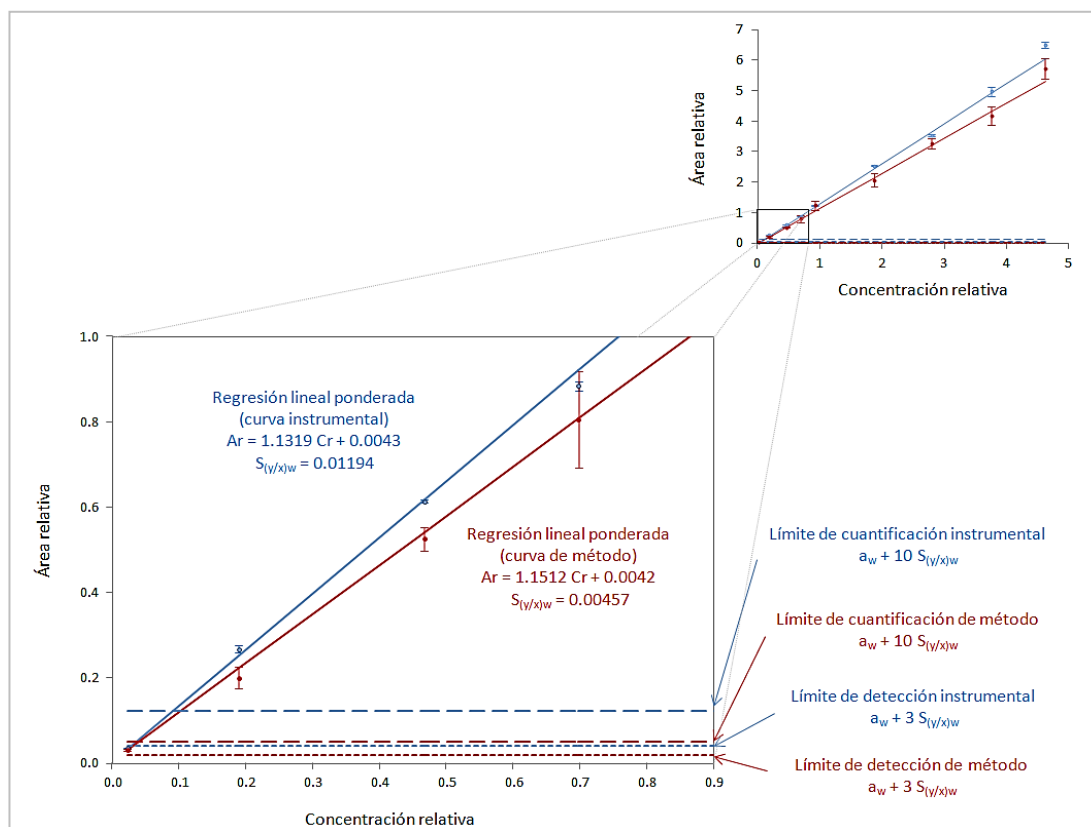


Figura 52. Rectas ajustadas por la regresiones lineales ponderadas de las curvas instrumental y de método del pireno y sus límites de detección y de cuantificación (líneas punteadas)

Debido a que la desviación de la regresión ponderada es directamente proporcional al producto del ponderador (W_i) por el cuadrado del residual (dado por el promedio de las áreas relativas, y_i , y el área ajustada por la regresión, \hat{y}_i) (ecuación 19), y considerando que dichos residuales $(y_i - \hat{y}_i)^2$ en las rectas tanto de la regresión instrumental como del método fueron similares (figura 53), se sugiere que el efecto de la heterocedasticidad contemplada en el ponderador, W_i , es mayor que el ajuste de la regresión.

$$S_{(y/x)w} = \sqrt{\frac{\sum_i w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad \text{(Ecuación 19)}$$

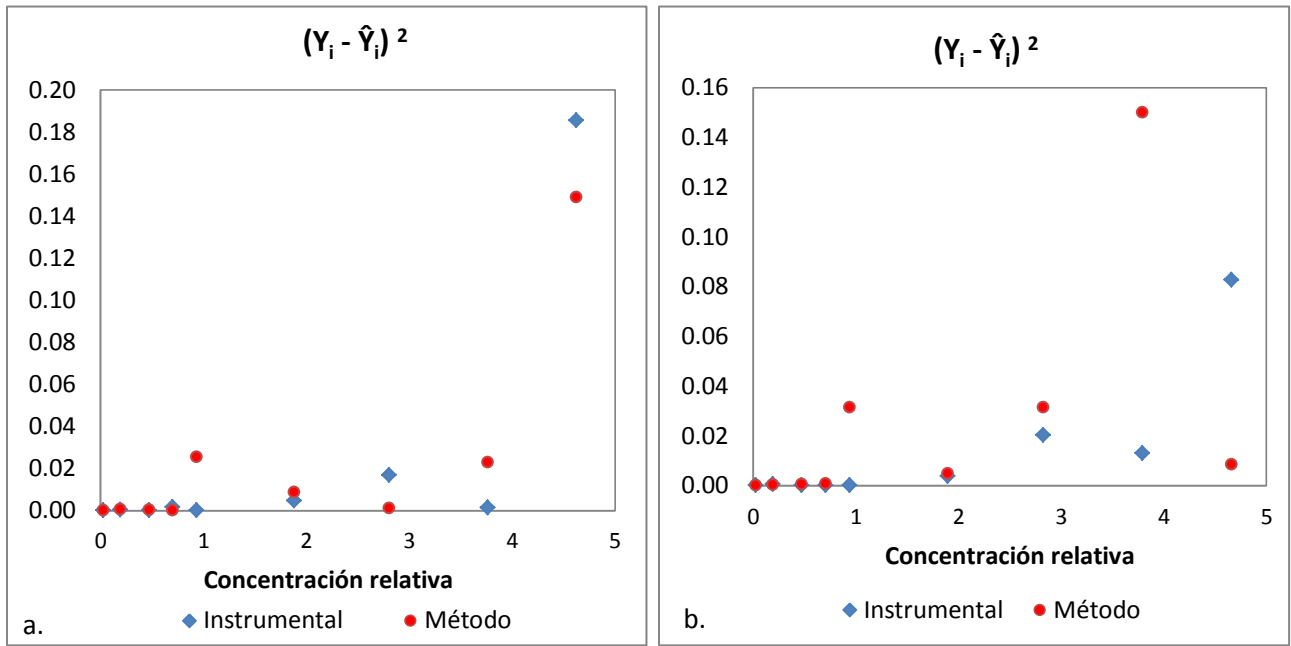


Figura 53. Residuales de las regresiones lineales de las curvas instrumentales y de método del a. pireno y del b. fenantreno por nivel.

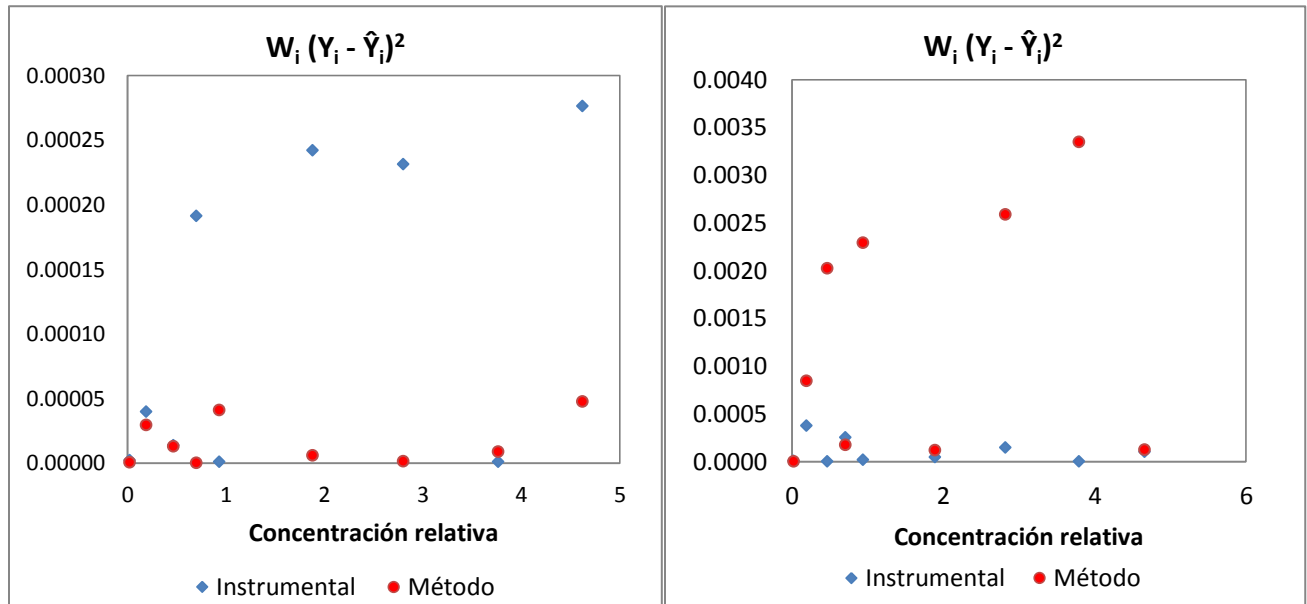


Figura 54. Productos de los ponderadores y los residuales de las regresiones lineales de las curvas instrumentales y de método del a. pireno y del b. fenantreno.

El estadístico $S_{(y/x)w}$ no fue proporcional al coeficiente de variación en cada nivel de calibración, ni al coeficiente de variación total que involucra a toda la regresión, por lo que su uso para la determinación de los límites tendrá que ser corroborado por métodos alternativos.

Para las curvas instrumentales se propone encontrar la masa mínima para cada HAP capaz de producir un pico en el cromatograma y determinar los límites sumando al área relativa de ésta señal y su desviación estándar (3 veces para el límite de detección y 10 veces para el límite de cuantificación). Una vez determinados los límites de detección y de cuantificación instrumentales y considerando la eficiencia de la extracción a estos niveles de concentración se podría proponer la masa de HAP para la adición sobre matriz y del análisis de estas muestras fortificadas obtener los límites de detección y de cuantificación de método.

5.9 Eficiencias determinadas por el método de adiciones patrón

La recuperación de los HAP en cada nivel de adición se calculó tomando como referencia el área relativa de la curva instrumental, de modo que al aplicar la ecuación 2 se obtuvieron los recobros para cada compuesto.

Como ejemplo, la tabla XLI muestra las recuperaciones para el fenantreno, y la figura 55 la gráfica del promedio de éstas frente a la masa correspondiente en cada nivel de la curva. En el apéndice F se encuentran los resultados para algunos compuestos representativos de los distintos comportamientos observados.

Tabla XLI. Recuperaciones del fenantreno en cada uno de los niveles de concentración de la curva de calibración del método.

Nivel	Masa [ng]	Fortificado 1	Fortificado 2	Fortificado 3	Promedio	DE**	CV
1	882.5	92.7	83.3	95.6	90.5	6.5	7.1
2	718.2	75.3	88.3	80.2	81.3	6.5	8.0
3	534.8	91.3	100.0	93.7	95.0	4.5	4.7
4	358.6	72.0	93.4	93.7	86.4	12.5	14.4
5	177.9	94.4	108.2	124.1*	108.9	14.9	13.6
6	133.3	97.4	82.5	103.8	94.5	10.9	11.6
7	89.2	85.9	77.9	79.4	81.1	4.3	5.3
8	36.2	74.5	63.5	80.1	72.7	8.5	11.6

* Fuera de los límites de aceptación (60 – 120 %) sugerido por el método TO13A de la EPA (1999)
 ** DE = Desviación estándar

Se evaluó la relación entre la recuperación y la masa con la que se realizó el enriquecimiento. Por ejemplo, para el fenantreno (figura 55) se observa que el nivel 9 (nivel fuera del rango de trabajo) presenta una desviación estándar muy grande, en los niveles 5 al 8 se observa una dependencia de la recuperación con respecto a la masa adicionada, mientras que para los niveles 1 al 4 se mantiene constante.

Por lo anterior se propuso que el cálculo del % de recuperación se realice de acuerdo a la cantidad de masa de HAP presente en la muestra. Por ejemplo, para aquellos compuestos con un comportamiento similar al del fenantreno (figura 55), el porcentaje de recuperación se calculó utilizando un modelo de regresión lineal en el intervalo de concentraciones donde la eficiencia del método fue función de la masa (nivel 5 al 8), mientras que para el intervalo donde no se observa dependencia de la eficiencia respecto a la masa se asignó como porcentaje de recuperación el valor promedio de los niveles correspondientes. Este análisis se realizó en el software “*Statistica 8.0 Statsoft Inc.*” alimentado con cada uno de los recobros por nivel.

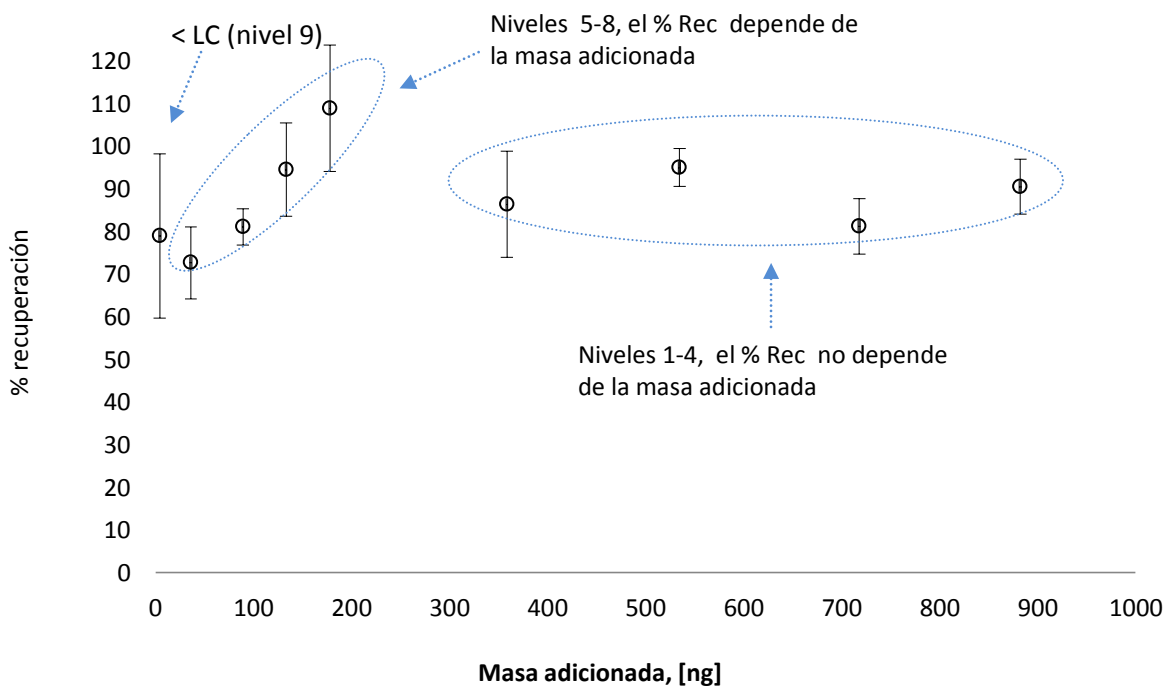


Figura 55. Recuperación del fenantreno en los nueve niveles de masas. Los círculos indican el valor promedio de las recuperaciones y las barras su desviación estándar

En la tabla XLII se encuentran las ecuaciones de la recta para calcular el porcentaje de recuperación y los intervalos donde la eficiencia fue función de la masa de HAP, también se muestran los valores de “p”, para el coeficiente de correlación de Pearson *r*, para la pendiente y para la ordenada al origen.

Para evaluar la significancia de la regresión, la hipótesis nula H_0 a probar sobre la pendiente fue “la pendiente es igual a cero” y en el caso de la ordenada al origen H_0 fue “la ordenada al origen es igual a cero”. Si los valores de “p” eran < 0.05 se rechazaron ambas H_0 con el 95 % de confianza (Montgomery *et al.* 2002). En el caso del coeficiente de correlación de Pearson (*r*) la hipótesis nula H_0 fue “el modelo no es lineal”, si el valor de “p” fue menor a 0.05 se rechazó la hipótesis nula con el 95 % de confianza.

Tabla XLII. % Recuperación en función de la masa de HAP.

HAP	Intervalo [ng]	% Recuperación = pendiente * ng de HAP + ordenada al origen					
		Pendiente	Valor de p (pendiente)	Ordenada al origen	Valor de p (ordenada)	r	Valor de p (r)
Naftaleno	4.4 - 178.5	0.230	0.000	62.9	0.000	0.85	0.000
Fluoreno	4.4 - 178.8	0.230	0.000	69.1	0.000	0.85	0.000
Fenantreno*	36.2 - 177.9	0.258	0.000	61.1	0.000	0.84	0.001
4,5-Metilfenantreno*	36.9 - 181.3	0.220	0.009	67.3	0.000	0.83	0.001
3,6-Dimetilfenantreno*	36.4 - 178.7	0.250	0.002	78.8	0.000	0.80	0.002
Antraceno*	36.9 - 181.5	0.245	0.001	63.7	0.000	0.84	0.001
1-Metilantraceno	36.9 - 181.5	0.295	0.000	62.1	0.000	0.87	0.000
9-Metilantraceno	36.5 - 179.2	0.281	0.000	61.4	0.000	0.85	0.000
Fluoranteno	4.4 - 179.1	0.129	0.012	85.9	0.000	0.64	0.010
9,10-Dimetilantraceno	358.9 - 883.2	0.103	0.000	42.15	0.000	0.93	0.000
7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno	4.7 - 340.3	0.113	0.000	101.4	0.000	0.71	0.000
Benzo[k]fluoranteno*	14.3 - 56.3	0.858	0.001	60.4	0.000	0.83	0.001
Benzo[e]pireno*	11.9 - 44.3	0.855	0.002	55.1	0.000	0.81	0.002
Benzo[a]pireno*	13.1 - 48.6	0.818	0.001	59.1	0.000	0.81	0.001
Perileno*	12.9 - 48.1	0.756	0.004	65.6	0.000	0.76	0.004
Dibenzo[a,c]antraceno	89.3 - 343.0	0.098	0.041	92.4	0.000	0.60	0.041
Indeno[1,2,3-cd]pireno	14.3 - 53.0	0.459	0.031	73.0	0.000	0.62	0.031
Dibenzo[a,h]antraceno	5.1 - 363.8	0.044	0.011	89.4	0.000	0.48	0.016
Benzo[ghi]perileno	4.9 - 54.5	0.586	0.011	61.8	0.000	0.70	0.011

* Se excluyó el nivel 9 de la regresión.

Cabe destacar, que para todos los HAP, el nivel 5 presentó recuperaciones más altas y con mayor desviación, esto fue probablemente debido a un error experimental durante la extracción del mismo.

En los HAP marcados con (*) en la tabla XLII se excluyó el nivel 9 (~5 ng adicionados), debido a que tiene una recuperación más alta y queda fuera de la tendencia lineal, indicando una falta de especificidad del método a ese nivel de masa probablemente debido a la presencia de interferentes en la matriz.

Los intervalos donde la recuperación se mantuvo constante se ilustran en la tabla XLIII. Se muestra el valor del coeficiente de correlación r y su respectivo valor de “p”. En todos los casos, “p” fue mayor a 0.05, no rechazando la hipótesis nula “El modelo no es lineal”. Por otro lado, la evaluación de la pendiente arrojó “p” mayor a 0.05, por lo que no se rechazó la hipótesis “la pendiente es igual a cero”, sugiriendo que la eficiencia no fue dependiente de la masa adicionada (Montgomery *et al.* 2002).

Tabla XLIII. % Recuperación independiente de la masa de HAP.

HAP	Intervalo [ng]	Valor promedio % Recuperación (n = 4)	± DE*	% CV	r	Valor de p (r)
Naftaleno	359.8 – 885.4	84.0	5.6	6.7	0.32	0.314
Acenaftileno	5.1 – 366.8	97.2	12.6	13.0	0.29	0.145
Acenafteno	5.2 – 369.5	88.1	12.8	14.5	0.34	0.083
Fluoreno	360.3 – 886.6	95.1	7.4	7.8	0.28	0.381
Fenantreno	358.6 – 882.5	88.2	5.9	6.7	0.03	0.932
4,5-Metilenfenantreno	365.4 – 899.3	91.3	5.3	5.8	0.02	0.956
3,6-Dimetilfenantreno	360.0 – 886.0	98.3	4.6	4.7	0.03	0.915
Antraceno	365.8 – 900.1	88.2	5.2	5.9	0.20	0.540
2-Metilantraceno	37.0 – 902.1	107.2	10.2	9.5	0.35	0.095
1-Metilantraceno	365.7 – 900.0	93.4	5.1	5.5	0.04	0.914
9-Metilantraceno	361.2 – 888.9	97.1	4.3	4.4	0.28	0.375
Fluoranteno	360.9 – 888.1	90.0	6.0	6.7	0.08	0.803
9,10-Dimetilantraceno	36.2 – 178.1	89.4	4.3	4.8	0.11	0.738
Pireno	4.4 – 891.1	87.3	7.1	8.1	0.03	0.866
Tripticeno	5.1 – 364.0	67.3	8.9	13.2	0.18	0.385
Benzo[a]fluoreno	4.6 – 333.1	83.0	9.7	11.7	0.21	0.302
Benzo[a]antraceno	4.9 – 352.6	87.1	8.6	9.9	0.23	0.249
Trifenileno+Criseno	4.1 – 298.0	89.0	9.1	10.2	0.32	0.108
Benzo[b]fluoranteno	4.6 – 329.1	83.6	8.3	9.9	0.03	0.898
Benzo[k]fluoranteno	89.6 – 344.0	91.2	6.7	7.3	0.25	0.436
Benzo[e]pireno	74.0 – 284.2	79.2	3.8	4.8	0.27	0.400
Benzo[a]pireno	81.2 – 311.7	86.2	5.0	5.8	0.45	0.143
Perileno	80.4 – 308.8	85.9	5.0	5.8	0.44	0.150
Dibenzo[a,c]antraceno	4.8 – 53.4	98.6	21.2	21.5	0.19	0.502
Indeno[1,2,3-cd]pireno	88.6 – 340.3	96.5	8.1	8.4	0.49	0.105
Benzo[ghi]perileno	91.1 – 349.8	89.7	4.9	5.5	0.20	0.532

*DE = Desviación estándar

Aunque se determinó la eficiencia de la extracción a los niveles de concentración adicionados y se propone un valor para la recuperación dependiendo de la masa de analito

extraída, en estudios posteriores deberá determinarse la eficiencia para las masas contenidas en el intervalo acotado entre el nivel 5 y 4 (~ 180 - 360 ng adicionados), o alternativamente hacer una evaluación de la recuperación a niveles cercanos entre sí y equidistantes a lo largo de todo el intervalo de interés. Con base en los resultados de éste trabajo, se puede esperar que dicha función sea una asíndota, en donde a valores de masas pequeños la recuperación sea más sensible a pérdidas durante el tratamiento de la muestra y a medida que la cantidad de analito adicionada aumente éstas pérdidas representen un porcentaje menor y en consecuencia la eficiencia se mantenga constante.

Por otra parte, la figura 56 compara las recuperaciones promedio en el intervalo independiente de la masa (tabla XLIII) con las eficiencias reportadas y evaluadas mediante el enriquecimiento de partículas emitidas de la combustión de diesel (Portet-Koltalo *et al.* 2009) o la fortificación sobre material de referencia certificado (Piñeiro-Iglesias *et al.* 2002) con hidrocarburos aromáticos policíclicos y analizadas mediante otras técnicas.

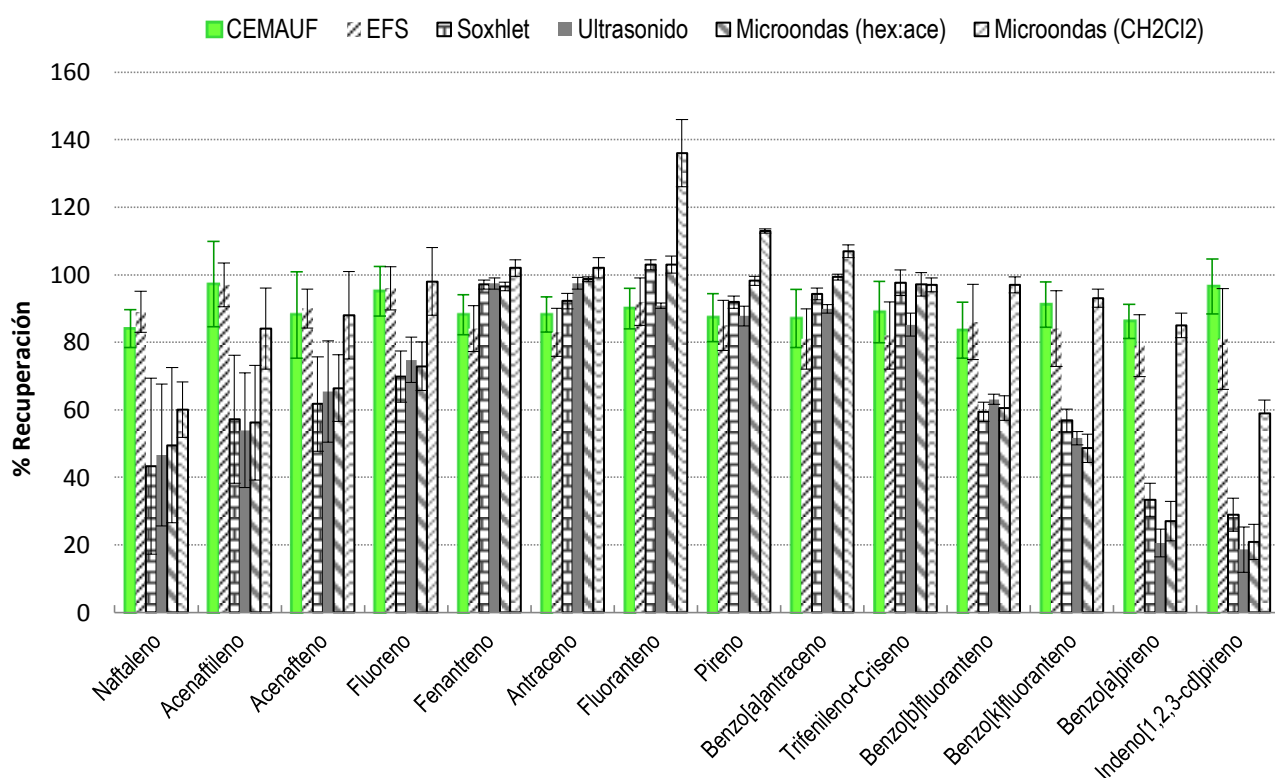


Figura 56. Comparación de los porcentajes de recuperación de HAP en partículas emitidas por la combustión de diesel entre la CEMAUF y otras técnicas reportadas en la literatura: extracción por fluidos supercríticos (EFS) (Portet-Koltalo *et al.* 2009), Soxhlet, ultrasonido y microondas (Piñeiro-Iglesias *et al.* 2002). Las barras indican el promedio de las recuperaciones y las barras su desviación estándar

5.10 Análisis de partículas emitidas por la combustión de diesel y biodiesel

Se analizaron 4 muestras de partículas emitidas por la combustión de biodiesel y otras 4 muestras de partículas emitidas por la combustión de diesel a diferentes regímenes del motor. En la tabla XLIV se muestran los nanogramos de HAP presentes en el ¼ de filtro extraído provenientes de la emisión de biodiesel y en la tabla XLV los correspondientes a la emisión de diesel. Todas las muestras se cuantificaron con las curvas de calibración de método, en la última columna de ambas tablas se encuentran los límites de cuantificación de cada HAP.

Tabla XLIV. Masa de HAP [ng] en los extractos orgánicos de las partículas emitidas por la combustión de biodiesel a diferentes regímenes de motor (rpm).

HAP	FT01 805 rpm	M3 1200 rpm	FT09 1600 rpm	FT11 1800 rpm	LCM
Naftaleno	54.8	53.3	31.6	39.6	4.6
Acenaftileno	61.6	60.2	32.9	22.0	7.7
Acenafteno ⁺	950.8*	821.3*	746.0*	518.7*	4.7
Fluoreno	192.0	286.5	157.2	104.1	13.8
Fenantreno	1008.2*	1030.0*	1125.4*	808.8	87.5
4,5-Metilenfenantreno	213.3	167.9	293.7	240.7	8.9
3,6-Dimetilfenantreno	169.8	134.6	290.7	236.6	20.7
Antraceno	227.1	184.4	210.5	153.4	14.6
2-Metilantraceno ⁺	75.4	57.0	88.0	70.6	21.7
1-Metilantraceno ⁺	802.8	724.2	1410.3*	1313.8*	8.5
9-Metilantraceno ⁺	69.7	<LCM	72.9	<LCM	61.7
Fluoranteno	147.2	91.2	176.7	152.7	14.1
9,10-Dimetilantraceno	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	382.0
Pireno	327.8	215.0	490.2	449.0	7.7
Tripticeno	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	2.3
Benzo[a]fluoreno	20.1	12.4	28.0	29.8	3.2
Benzo[a]antraceno	23.1	10.4	27.4	29.7	1.3
Trifenileno+Criseno	36.7	15.5	43.6	52.1	6.0
Benzo[b]fluoranteno	9.3	3.9	11.0	15.3	2.4
7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	14.0
Benzo[k]fluoranteno	15.5	5.7	17.8	23.2	3.3
Benzo[e]pireno	10.0	4.5	12.3	16.4	1.3
Benzo[a]pireno	10.1	3.3	6.8	7.2	1.5
Perileno	<LCM	<LCM	<LCM	<LCM	2.5
Dibenzo[a,c]antraceno	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	58.2
Indeno[1,2,3-cd]pireno	6.9	<LCM	8.4	11.2	4.1
Dibenzo[a,h]antraceno	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	8.8
Benzo[ghi]perileno	10.6	4.8	14.4	18.0	1.0
LCM Límite de cuantificación del método					
* Requieren dilución,					
* Identificación tentativa debido a que el espectro de masas no presentó un valor de "matching" > 60.					
<LDM No detectado, valor menor al límite de detección del método					
<LCM No cuantificable, valor menor al límite de cuantificación del método.					

Tabla XLV. Masa de HAP [ng] en los extractos orgánicos de las partículas emitidas por la combustión de diesel a diferentes regímenes de motor (rpm).

HAP	L9 800 rpm	L7 1200 rpm	L5 1500 rpm	L3 2000 rpm	LCM
Naftaleno	57.2	41.1	42.8	38.4	4.6
Acenaftileno	63.9	28.3	25.6	23.2	7.7
Acenafteno ⁺	860.9	482.8	421.5	239.9	4.7
Fluoreno	186.8	91.9	95.2	90.4	13.8
Fenantreno	1213.0*	809.6	910.0	748.3	87.5
4,5-Metilenfenantreno ⁺	265.8	222.0	266.0	241.4	8.9
3,6-Dimetilfenantreno ⁺	209.4	212.9	294.0	265.9	20.7
Antraceno	221.7	151.1	147.6	123.7	14.6
2-Metilantraceno ⁺	70.8	55.4	58.7	53.9	21.7
1-Metilantraceno ⁺	747.8	778.1	805.6	758.8	8.5
9-Metilantraceno ⁺	<LCM	<LCM	<LCM	<LCM	61.7
Fluoranteno	369.7	395.8	599.2	662.9	14.1
9,10-Dimetilantraceno	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	382.0
Pireno	657.2	762.9	1130.6*	1253.3*	7.7
Tripticeno	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	2.3
Benzo[a]fluoreno	31.9	34.5	53.0	62.8	3.2
Benzo[a]antraceno	46.5	49.0	85.4	143.7*	1.3
Trifenileno+Criseno	66.9	80.0	150.2	269.9*	6.0
Benzo[b]fluoranteno	23.2	32.4	58.9	144.4*	2.4
7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno	<LDM	<LDM.	<LDM	<LCM.	14.0
Benzo[k]fluoranteno	39.8	52.2	97.6	230.9*	3.3
Benzo[e]pireno	23.5	34.4	61.5	142.6*	1.3
Benzo[a]pireno	18.8	15.7	18.6	32.6	1.5
Perileno	3.7	3.0	3.6	5.5	2.5
Dibenzo[a,c]antraceno	8.3	7.5	7.7	10.9	58.2
Indeno[1,2,3-cd]pireno	16.6	27.0	59.7	136.4*	4.1
Dibenzo[a,h]antraceno	<LCM	<LCM	<LCM	19.7	8.8
Benzo[ghi]perileno	25.4	46.2	106.3	244.2*	1.0
LCM Límite de cuantificación del método					
* Requieren dilución					
+ Identificación tentativa debido a que el espectro de masas no presentó un valor de "matching" > 60.					
<LDM No detectado, valor menor al límite de detección del método					
<LCM No cuantificable, valor menor al límite de cuantificación del método.					

Se calculó la masa de cada HAP por miligramo de partícula emitida en todas las muestras dividiendo los valores reportados en las tablas XLIV y XLV entre los miligramos de partícula extraídos (tabla XXII). Se evaluó el porcentaje de reducción de HAP en la emisión proveniente de la combustión de la mezcla B10 con respecto a la emisión de diesel (figura 57) según la ecuación 35.

$$\% \text{ Reducción} = 100 - \left[\frac{\text{ng HAP mg}^{-1} \text{ partícula emitida (combustión de biodiesel)}}{\text{ng HAP mg}^{-1} \text{ partícula emitida (combustión de diesel)}} \right] * 100 \quad (\text{Ecuación 35})$$

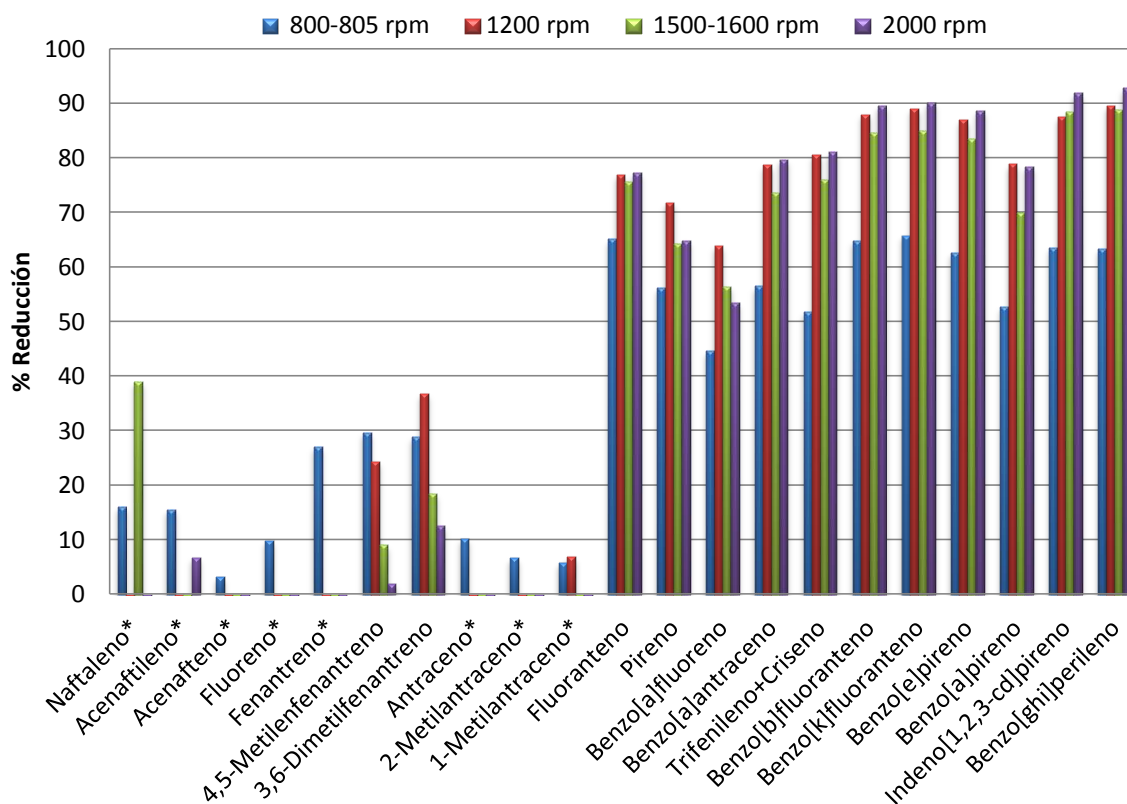


Figura 57. Porcentaje de reducción en la emisión de HAP en fase particulada usando biodiesel

En los compuestos marcados con (*) se observó un aumento en la emisión en las muestras de biodiesel de 1200 a 2000 rpm, aunque hay que considerar que estas pruebas se hicieron sin torque en el motor y que algunos de estos HAP se identificaron tentativamente. Por otra parte, los mayores porcentajes de reducción se presentaron en los HAP de peso molecular mayor a 202 g mol^{-1} y oscilaron desde 2.0 % (4,5-Metilenfenantreno 200 rpm) y 92.7 % (benzo[*ghi*]perileno, 2000 rpm).

6. Conclusiones

Se evaluaron 4 variables experimentales para extracción a microescala de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en partículas emitidas por la combustión de diesel y biodiesel empleando una celda asistida por ultrasonido. Los mejores resultados fueron: 2 extracciones de 5 min a 60°C, con la celda conectada a un condensador y reduciendo el volumen del extracto mediante el flujo suave de nitrógeno gaseoso.

La precisión del método fue evaluada en cada nivel y entre niveles mediante el coeficiente de variación (CV) de los factores de respuesta relativos (F_{rr}), todos se encontraron dentro de los límites marcados por el método de referencia EPA- TO13A (< 30%). La precisión en cada nivel de adición se evaluó mediante el coeficiente de variación de los F_{rr} y osciló entre 1.3 % (benzo[e]pireno a 24.7 ng) y 18.5% (dibenzo[a,c]antraceno a 100.8 ng a 100.8 ng), mientras que la precisión en todo el intervalo de calibración calculada con el coeficiente de variación entre todos los niveles osciló entre el 6.4 % (benzo[e]pireno) y 19.5 % (dibenzo[a,c]antraceno).

Los intervalos lineales de trabajo fueron delimitados excluyendo aquellos niveles donde el coeficiente de variación fue mayor al 20 %. En los intervalos de calibración del método no se observó homocedasticidad en las varianzas entre al menos un par de niveles lo que sugirió el uso de regresión lineal ponderada. Se calcularon las pendientes, las ordenadas al origen y las desviaciones de las regresiones lineales ponderadas para las curvas de calibración instrumentales y de método.

La linealidad se evaluó mediante el coeficiente de determinación r^2 cuyos valores se observaron entre el 0.929 (Tripticeno) y 0.995 (Pireno) ($p < 0.05$ para todos los coeficientes de correlación de Pearson). Además se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para todas las regresiones lineales, mediante el cual se rechazó en todos los HAP la hipótesis nula “el modelo no es lineal” con 99 % de confianza.

Se calcularon los límites de detección y de cuantificación de las curvas de calibración instrumentales y de método. La desviación de la regresión $S_{(y/x)w}$ tuvo el impacto más

importante en el valor de los límites tanto de detección como de cuantificación, es decir, aquellos HAP en los que la desviación de la regresión en las curvas de método con respecto a los instrumentales fueron mayores, presentaron límites de método numéricamente superiores y viceversa. Las varianzas de las regresiones fueron directamente proporcionales al producto entre el residual de la recta de regresión y el ponderador, siendo éste último el que tiene mayor efecto sobre el cálculo de $S_{(y/x)w}$, se observó que éste estadístico no fue directamente proporcional a la variabilidad entre las réplicas de cada nivel de las curvas. Debido a esto es importante re-evaluar en futuros estudios los límites de detección y cuantificación mediante otro procedimiento, por ejemplo, analizando estándares y muestras fortificadas con masas mínimas de HAP. Los límites de cuantificación de método se encontraron entre 1.0 ng para el benzo[ghi]perileno y 382.0 ng para el 9,10-dimetilantraceno.

La eficiencia del método se evaluó por adición patrón a diferentes niveles de masa. Se determinaron los intervalos para cada HAP donde el porcentaje de recuperación fue función de la masa adicionada, así como las ecuaciones de las rectas que describen dicha relación. Esta dependencia se presentó en la mayoría de los HAP en el intervalo de masa de 4 ng a 180 ng aproximadamente. Para los intervalos de masa donde la eficiencia fue constante > 350 ng, se asignó el valor promedio de los porcentajes de recuperación como la eficiencia correspondiente a dichos niveles de adición. Los valores promedio del porcentaje de recuperación incluyendo todos los niveles de adición oscilaron entre el $69.2 \pm 8.9 \%$ (Tripticeno) y el $106.7 \pm 17.2 \%$ (7,12-dimetilbenzo[a]antraceno), valores que se encuentran dentro de los límites de aceptación marcados por el método de referencia EPA TO13-A (60 – 120 %).

Se analizaron 4 muestras de partículas emitidas por la combustión de biodiesel y otras 4 por la combustión de diesel a 4 diferentes regímenes del motor sin torque, se evaluó el porcentaje de reducción en la emisión de HAP y se observó que la reducción se presentó para los HAP de mayor peso molecular 202 g mol^{-1} . Los porcentajes de reducción oscilaron entre 2.0 % (4,5-metilenfenantreno, 2000 rpm) y 92.7 % (benzo[ghi]perileno, 2000 rpm). Sin embargo, para los HAP de menor peso molecular se observó un aumento en la emisión, aunque hay que considerar que algunos de éstos se identificaron tentativamente.

Se presentó la solicitud de la patente ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial de la “*Celda de extracción a microescala, asistida por ultrasonido, con y sin reflujo, acoplada a un sistema de filtración*” con número de registro MX/a/2012/000790, así como del “*Proceso para extraer, filtrar, concentrar y recuperar compuestos orgánicos en matrices sólidas a microescala*” con número de registro MX/a/2012/000789.

El método permite minimizar la cantidad de muestra, el volumen de disolvente y el tiempo de análisis requeridos respecto a los procedimientos de referencia o anteriormente establecidos en el laboratorio, cumpliendo con los criterios de calidad de eficiencia y precisión establecidos en el método de referencia más cercano al alcance de este método (EPA TO13A).

La miniaturización del sistema de extracción permitió el desarrollo de un método ambientalmente amigable debido a la disminución de los insumos, es importante tomar en cuenta que el uso de una cantidad menor de muestra fue posible debido a su homogeneidad y representatividad. Se debe considerar también el compromiso existente entre las ventajas que representan el uso de material a microescala y el aumento en el error que conlleva trabajar con cantidades pequeñas de analito, por lo que el seguimiento de las buenas prácticas de laboratorio y el uso de material calibrado y de alta calidad son fundamentales.

7. Recomendaciones

Se sugiere que los coeficientes de variación que involucran a todos los niveles se utilicen como límites de control de calidad para análisis posteriores de los HAP estudiados en esta matriz.

En este trabajo se determinaron los intervalos de concentración donde la eficiencia del método depende de la cantidad de analito presente en la muestra y aquellos intervalos donde permanece constante, dichos valores pueden tomarse como criterios de calidad para evaluar la eficiencia en la recuperación en posteriores análisis efectuando la adición de HAP deuterados como subrogados. Para determinar con mayor detalle el comportamiento del porcentaje de recuperación en función de la masa adicionada se pueden fortificar muestras con niveles más cercanos y equidistantes que abarque el intervalo donde la función probablemente sea asíndota (por ejemplo entre el nivel 4 al 6).

En próximos proyectos puede evaluarse la exactitud del método mediante el análisis de material de referencia certificado, así como los límites de detección y de cuantificación instrumentales y de método mediante estándares y muestras fortificadas con masas de HAP inferiores al nivel mínimo utilizado en este estudio.

Para evaluar con mayor profundidad el método propuesto se pueden estudiar en el futuro varios aspectos: sus fuentes principales de incertidumbre, determinar su robustez mediante un diseño de experimentos, etc.

8. Referencias

1. Amador-Muñoz O. (2003). Estudios de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos adsorbidos a las partículas $\leq 10 \mu\text{m}$ del Suroeste de la Ciudad de México. UNAM.
2. Amador-Muñoz O., Villalobos-Pietrini R., Miranda J. Vera-Ávila L.E. (2011). Organic Compounds of $\text{PM}_{2.5}$ in Mexico Valley: Spatial and temporal patterns, behavior and sources. *Science of Total Environment*, 409, 1453-1465.
3. Anastas P.T., (1999). Green Chemistry and the role of analytical methodology development. *Critical. Reviews in Analytical Chemistry*, 20, 167.
4. Araujo P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, 877, 2224-2234.
5. Armenta S., Garrigues S., De la Guardia M. (2008). Green Analytical Chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, 27, 497-511.
6. Baeza A., De Santiago A., Galicia E., Martínez J. (2005). Total Microscale Analytical Chemistry: Instrumental Analysis Experimental Teaching. *3rd International Microscale Chemistry Symposium*, 1,1-4.
7. Banjoo D., Nelson P., (2005). Improved ultrasonic procedures for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. *Journal of Chromatography A*, 1066, 9-18.
8. Baron P.A.y Willeke K. (2001). Aerosol measurement. *Wiley Interscience*, N.Y. pp. 48-51.
9. Bergvall C., Westerholm R. (2009). Determination of highly carcinogenic dibenzopyrene isomers from two diesel- and two gasoline-fueled light duty vehicles. *Atmospheric Environment*, 43, 3883-3890.
10. Bi X., Sheng G., Peng P., Cheng Y., Zhang Z., Fu J. (2003). Distribution of particulate- and vapor-phase *n*-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in urban atmosphere of Guangzhou, China. *Atmospheric Environment*, 37, 289-298.
11. Borrás E., Tortajada-Genaro L.A., Vázquez M., Zielinska B. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbons exhaust emissions for different reformulated diesel fuels and engine operating conditions. *Atmospheric Environment*, 43, 5944-5952.
12. Castells P., Santos F.J., Galceran M.T. (2003). Development of a sequential supercritical fluid extraction method for the analysis of nitrated and oxygenated derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban aerosols. *Journal of Chromatography A*, 1010, 141-151.

13. Cincinelli A., Del Bubba M., Martellini T., Gambaro A., Lepri L. (2007). Gas-particle concentration and distribution of *n*-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere of Prato (Italy). *Chemosphere*, 68, 472 – 478.
14. Chrysikou L.P., Gemenetzi P.G., Samara C.A. (2009). Wintertime size distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and organochlorine pesticides (OCPs) in the urban environment. Street- vs rooftop- level measurements. *Atmospheric Environment*, 43, 290 -300.
15. Cousins I.T. y Mackay D. (2001). Gas- particle Partitioning of organic compounds and its Interpretation Using Relative solubilities. *Environmental Science and Technology*, 35, 643-647.
16. Di Filippo P., Riccardi C., Pomata D., Buiarelli F. (2010). Concentration of PAHs and nitro- and methyl- derivatives associated with a size-segregated urban aerosol. *Atmospheric Environment*, 44, 2742-2749.
17. Ericsson M., Colmsjö A. (2000). Dynamic microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 877, 141-151.
18. Eurachem (1998). The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. EURACHEM guide, a focus for analytical chemistry in Europe. ISBN 0-948926-12-0. LGC Ltd p.30
19. Grantz D.A., Garner J.H.B., Johnson D.W., (2003). Ecological effects of particulate matter. *Environment International*, 29, 213– 239.
20. Grassian V.H., (2001). Heterogeneous uptake and reaction of nitrogen oxides and volatile organic compounds on the surface of atmospheric particles including oxides, carbonates, soot and mineral dust: implications for the chemical balance of the troposphere. *International Reviews in Physical Chemistry*, 20, 467-548.
21. Godleski J.J., Verrier R.L., Koutrakis P., Catalano P., Coull B., Reinisch U., Lovett E.G., Lawrence J., Murthy G.G., Wolfson J.M., Clarke R.W., Nearing B.D., Killingsworth C. (2000). Mechanisms of morbidity and mortality from exposure to ambient particles. *Research Report Health Effects Institute*, 91, 5–88.
22. Hunt A., Abraham J.L., Judson B., Berry C.L. (2003). Toxicologic and Epidemiologic Clues from the Characterization of the 1952 London Smog Fine Particulate matter in Archival Autopsy Lung Tissues. *Environmental Health Perspectives*, 111, 1209-1214.
23. International Agency for Research on Cancer (2010). Painting, firefighting and shiftwork Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk to humans. Sitio web <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol98/index.php> consultado en Mayo del 2012.

24. International Agency for Research on Cancer (2012). Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk to humans. Sitio web <http://monographs.iarc.fr> consultado 12 de Mayo del 2012.
25. Ibañez J., (2005). Microscale Chemistry in Latin America. *Universitas Scientiarum*, 10, 79-83.
26. IPCC 2006 Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories Volumen 2 Energy
27. Kamil K., Ahmet.S. (2003). Renewable energy potential and utilization in Turkey. *Energy Conversion and Management*, 44, 459-47.
28. Karthikeyan S., Balasubramanian R., Wei S.S. (2006). Optimization and validation of a low temperature microwave-assisted extraction method for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulate matter. *Talanta*, 69, 79–86.
29. Kaupp H., McLachlan M.S. (2000). Distribution of polychlorinated dibenzo-P-dioxins and dibenzofuranes (PCDD/Fs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) within the full size range of atmospheric particles. *Atmospheric Environment*, 34, 73–83.
30. Knothe G. (2010). Biodiesel and Renewable Diesel: a comparison. *Progress in Energy and Combustion Science*, 36, 374-373.
31. Leyva y Nuncio M.A, Rodriguez Martinez N. (1999). El Diesel. *Octanaje*, 24. PEMEX.
32. Lee S.C., Ho K.F., Chan L.Y., Zielinska B., Chow J.C. (2001). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and carbonyl compounds in urban atmosphere of Hong Kong. *Atmospheric Environment*, 35, 5949-5960
33. LGEEPA (Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al ambiente 2010). Diario Oficial de la Federación (DOF). Artículo tercero inciso VI y VII.
34. Liu L., Liu Y., Lin J., Tang N., Hayakawa K., Maeda T. (2007). Development of analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in airborne particulates: A review. *Journal of Environmental Sciences*, 19, 1-11.
35. Lobscheid A. B., Madalena R.L., Mickone T.E. (2004). Contribution of locally grown foods in cumulative exposure assessments. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 14, 60–73.
36. Lozada I., Islas J., Grande G. (2010). Environmental and economic feasibility of palm oil biodiesel in the Mexican transportation sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.14, 486-492.
37. Lundstedt S., Van Bavel B., Haglund P., Tysklind M., Öberg L. (2000). Pressurized liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Journal of Chromatography A*, 883 pp 151-162

38. Luque de Castro M.D., Jiménez-Cardona M.M. (2000) Where is supercritical fluid extraction going? *Trends in analytical Chemistry*, 19, 223-228.
39. Manahan S.E. (2007). Introducción a la química ambiental. *Reverté*, España, pp 385, 401-404,451.
40. Mannino M.R., Orecchio S. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) indoor dust matter of Palermo (Italy) area: Extraction, CG-MS analysis, distribution and sources. *Atmospheric Environment*, 42, 1801-1817.
41. Masera O., Rodríguez N., Lazcano I., Trän D., Probst O., Weber M., Müller-Langer F. (2006). Potenciales y viabilidad del uso de Bioetanol y Biodiesel para el transporte en México. *Secretaría de Energía, Banco Interamericano de Desarrollo y Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ)*. ISBN 970-9983-14-8.
42. Martínez E., Gros M., Lacorte S., Barceló D. (2004). Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic compounds hydrocarbons in water, sediments and mussels. *Journal of Chromatography A*, 1047, 181-188.
43. Márques de Cantú M.J. (1998). Probabilidad y Estadística para las Ciencias Químico-Biológicas. *McGraw-Hill*, México, pág. 452-454.
44. Miller J.N. y Miller J.C. (2002). Estadística y quimiometría para química analítica. *Perason*, España pp.111-143
45. Medina Valtierra María de la Luz (2010). Diseño y estandarización de un método analítico para la determinación de disruptores endócrinos en partículas suspendidas \leq a 2.5 μm . Tesis de Licenciatura. UNAM.
46. Monteiro M.R., Pepe A.R, Morais L., Gilberto F.A. (2008). Critical review on analytical method for biodiesel characterization. *Talanta*. 77, 593-605.
47. Montgomery D.C, Peck E.A. y Vining G.G (2002). Introducción al análisis de regresión lineal. *Compañía Editorial Continental CECSA*. México, pág. 23 – 26.
48. Namiesnik J., (2001) Green analytical Chemistry – Some Remarks. *Journal of Separation Science*, 24, 151-153.
49. Norma internacional ISO/IEC 17025:2005 (ES). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
50. Norma Oficial Mexicana NOM-020-SSA1-1993, Salud ambiental. Criterio para evaluar el valor límite permisible para la concentración de ozono (O₃) de la calidad del aire ambiente. Criterio para evaluar la calidad del aire.
51. Norma oficial mexicana NOM-021-SSA1-1993. “Salud ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto al monóxido de carbono (CO). Valor normado

- para la concentración de monóxido de carbono (CO). en el aire ambiente, como medida de protección a la salud de la población”.
52. Norma oficial mexicana NOM-022-SSA1-1993. “Salud ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto al bióxido de azufre (SO₂). Valor normado para la concentración de (SO₂) en el aire ambiente, como medida de protección a la salud de la población”.
 53. Norma oficial mexicana NOM-023-SSA1-1993. “Salud ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto al bióxido de nitrógeno (NO₂). Valor normado para la concentración de (NO₂) en el aire ambiente, como medida de protección a la salud de la población”.
 54. Norma oficial mexicana NOM-025-SSA1-1993. “Salud ambiental. Criterio para evaluar el valor límite permisible para la concentración de material particulado. Valor límite permisible para la concentración de partículas suspendidas totales PST, partículas menores a 10 micrómetros PM₁₀ y partículas menores de 2.5 micrómetros PM_{2.5} de la calidad del aire ambiente. Criterios para evaluar la calidad del aire.
 55. Norma oficial mexicana NOM-026-SSA1-1993. “Salud ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto al Plomo (Pb). Valor normado para la concentración de (Pb) en el aire ambiente, como medida de protección a la salud de la población”.
 56. Norma oficial mexicana NOM-086-SEMARNAT-SENER-SCFI-2005. “Especificaciones de los combustibles fósiles para la protección ambiental”.
 57. Ozcan S., Aydin M.E. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and organochlorinated pesticides in urban air of Konya, Turkey. *Atmospheric Research*, 93, 715-722.
 58. Perraudin E., Budzinski H., Villenave E. (2005). Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on particles of atmospheric interest using pressurized fluid extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383, 122-131.
 59. Piñeiro-Iglesias M., López-Mahía P., Vázquez-Blanco E., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodríguez D. (2002). Problems in extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from diesel particulate matter. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 22, 129 – 146.
 60. Polichetti G., Cocco S., Spinali A., Trimarco V., Nunziata A. (2009). Effects of particulate matter (PM₁₀, PM_{2.5} and PM₁) on the cardiovascular system. *Toxicology* 261, 1–8.
 61. Portet-Koltalo F., Oukebdane K., Dionnet F., Desbène P.L. (2009). Optimization of supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitrated derivatives adsorbed on highly sorptive diesel particulate matter. *Analytical Chimica Acta*, 651, 48-56.

62. Reid J.P. y Slayer R.M. 2002. Chemistry in the Clouds: The role of aerosols in Atmospheric Chemistry. *Science Progress*, 85, 263-296.
63. Ritcher B.E. (2000). Extraction of Hydrocarbon contamination from soil using accelerated solvent extraction. *Journal of Chromatography A*, 874, 217-224.
64. Sánchez-Prado L., García-Jares C., Llompart M. (2010). Microwave-assisted extraction. Application to the determination of emerging pollutants in solid samples. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2390-2414.
65. Seaton A., MacNee W., Donaldson W., Godden D. (1995). Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet*, 345, 176–178.
66. Secretaría de Energía (SENER) y Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ). Recommendations for a Mexican biodiesel standard and the infrastructure required for its handling (2010) México D.F.
67. Secretaría de Medio a Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México y Centro de Investigaciones en Ecosistemas (2008). Análisis integrado de las tecnologías, el ciclo de vida y la sustentabilidad de las opciones y escenarios para el aprovechamiento de la bioenergía en México.
68. Shimmo M., Anttila P., Hartonen K., Hyötyläinen T., Paatero J., Kulmala M., Riekkola M.L. (2004). Identification of organic compounds in atmospheric aerosol particles by on-line supercritical CO₂ extraction-liquid chromatography-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1022, 152-159.
69. Singh M.M., Szafran Z., Pike R.M. (1999) Microscale Chemistry and Green Chemistry Complementary pedagogies. *Journal of Chemical Education*, 76, 1684-1686.
70. Song Y.F., Jing X., Flelischmann S., Wilke B.M. (2002). Comparative study of extraction methods for determination of PAHs from contaminated soils and sediments. *Chemosphere*, 48, 993-1001.
71. Steel R.G.D. y Torrie J.H. (1995). Bioestadística. Principios y procedimientos. 2a edición. Mc Graw Hill, México. p 622.
72. Tadeo J.L., Sánchez-Brunete C., Albero B., García-Valcárcel A.I. (2010). Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. Review. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2415-2440.
73. Tobiszewski M., Mechlinska A., Zygmunt B., Namiesnik J. (2009). Green Analytical Chemistry in Sample preparation for determination of trace organic pollutants. *Trends in Analytical Chemistry*, 28, 943-951.
74. Tsai J.H., Chen S.J., Huan K.L., Lin Y.C., Lee W.J., Lin C.C., Lin W.Y. (2010). PM, carbon and PAH emissions from a diesel generator fuelled with soy-biodiesel blends. *Journal of Hazardous Materials*, 179, 237–243.

75. Turrio-Baldasari L., Batistelli C.L., Iamiceli A.L. (2003). Evaluation of the efficiency of the extraction of PAHs from diesel particulate matter with pressurized solvents. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 375, 585-595.
76. US EPA Environmental Protection Agency. Compendium of methods for the determination of toxic organic compounds in ambient air. 2a Edición. Method TO13-A Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Ambient Air using Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS).
77. US EPA Environmental Protection Agency. Serie SW-846 Método 3540. Soxhlet Extraction.
78. US EPA Environmental Protection Agency. Serie SW-846 Método 3545. Pressurized Fluid Extraction PFE.
79. US EPA Environmental Protection Agency. Serie SW-846 Método 3550. Ultrasonic Extraction.
80. Vasconellos P.C., Zacarias D., Pires M.A.F., Pool C.S., Carvalho L.R.F. (2003). Measurements of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particles from the metropolitan area of São Paulo city, Brazil. *Atmospheric Environment*, 37, 3009-3018.
81. Valle-Hernández B.L., Mujica-Álvarez V., Salinas-Talavera E., Amador-Muñoz O., Murillo-Tovar M.A., Villalobos-Pietrini R., De Vizcaya-Ruiz A. (2010). Temporal variation of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in PM₁₀ y and PM_{2.5} collected in the Northern Mexico City. *Science of the Total Environment*, 408, 5429-5238.
82. Villalobos-Pietrini R., Amador-Muñoz O., Waliszewski S., Hernández-Mena L., Munive-Colin Z., Gómez-Arroyo S., Bravo-Cabrera J.L., Frías-Villegas A. (2006) Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbons associated with extractable organic matter from airborne particles ≤10 μm. in Southwest Mexico City. *Atmospheric Environment*, 40, 5845–585.
83. Villalobos-Pietrini R., Hernández-Mena L., Amador-Muñoz O., Munive-Colin Z., Bravo-Cabrera J.L., Gómez-Arroyo S., Frías-Villegas A., Waliszewski S., Ramirez Pulido J. y Ortiz Muñiz R. (2007) Biodirected mutagenic chemical assay of PM₁₀ extractable organic matter in Southwest Mexico City. *Mutation Research: Genetic, Toxicology and Environmental. Mutagenesis*, 634, 192-204.
84. Wardencki W., Curylo J., Namiesnik J. (2005). Green Chemistry-Current and Future Issues Review. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14, 389-395.
85. WHO Regional Office for Europe. (2000). Chapter 5.9. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) en *Air quality Guidelines*. 2da Edición, Dinamarca.

86. Wu S.P., Tao S., Liu W.X. (2006). Particle size distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons in rural and urban atmosphere on Tianjin, China. *Chemosphere*, 62, 357-367.
87. Xia Y., Han Y., Zhu P., Wang S., Gu A. Wang L., Lu C., Fu G., Song L., Wang X. (2009). Relation between urinary metabolites of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Human Semen Quality. *Environmental Science & Technology*, 43, 4567-4573.
88. Yang Y., Gharaibeh A., Hawthorne S.B., Miller D.J. (1995). Combined temperature/modifier effects on supercritical CO₂ extraction efficiencies of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental samples. *Journal of Analytical Chemistry*, 67, 641-646.
89. Zhou Y.S., Liu W.M., Zhao J.H. (2005). Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter by on line micro-pressurized liquid extraction coupled with capillary gas chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 33, 1231-1234.

Apéndice A

Espectros de masas

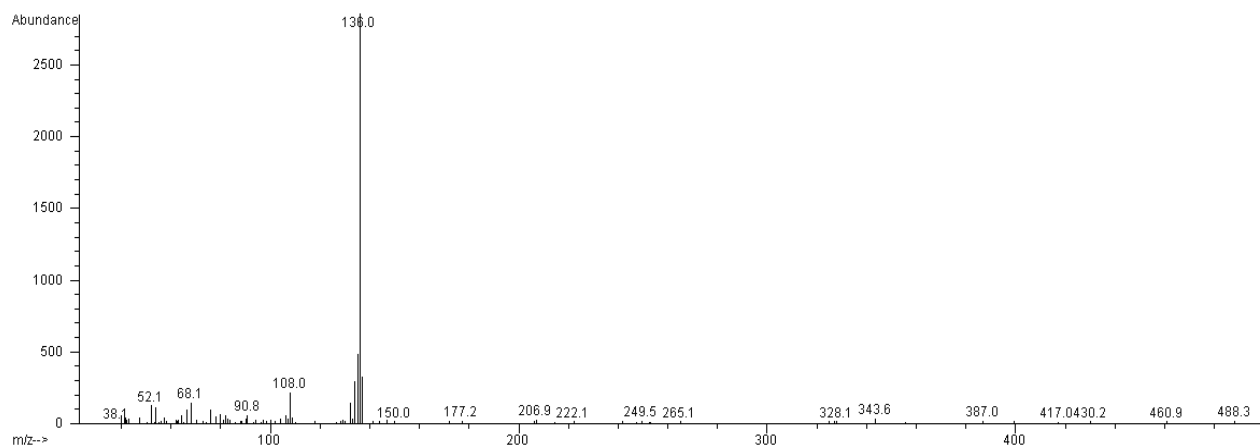


Figura A1. Espectro de masas del Naftaleno- d_8 , peso molecular = 136 g mol^{-1}

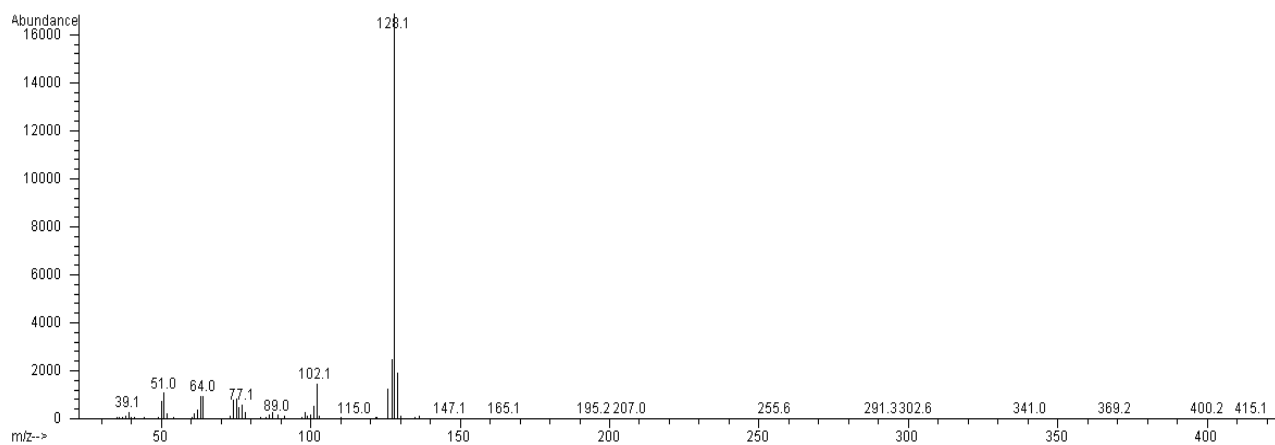


Figura A2. Espectro de masas del Naftaleno, peso molecular = 128 g mol^{-1}

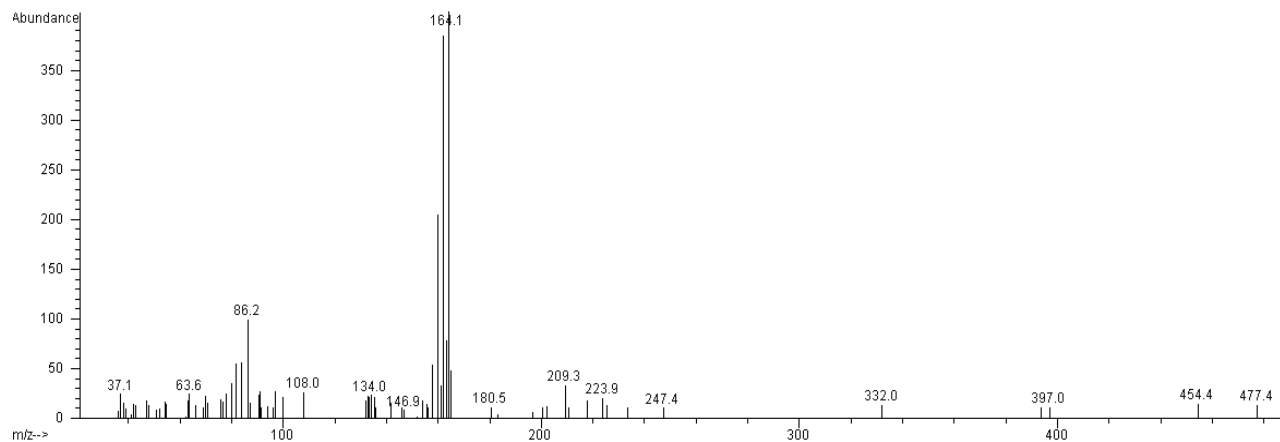


Figura A3. Espectro de masas del Acenafteno- d_{10} , peso molecular = 164 g mol^{-1}

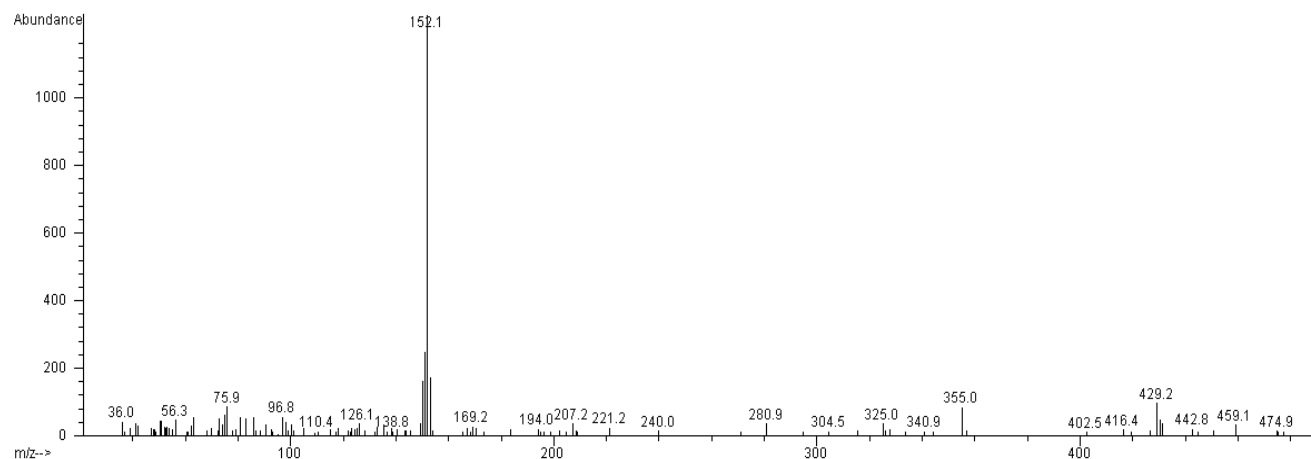


Figura A4. Espectro de masas del Acenafileno, peso molecular = 152 g mol⁻¹

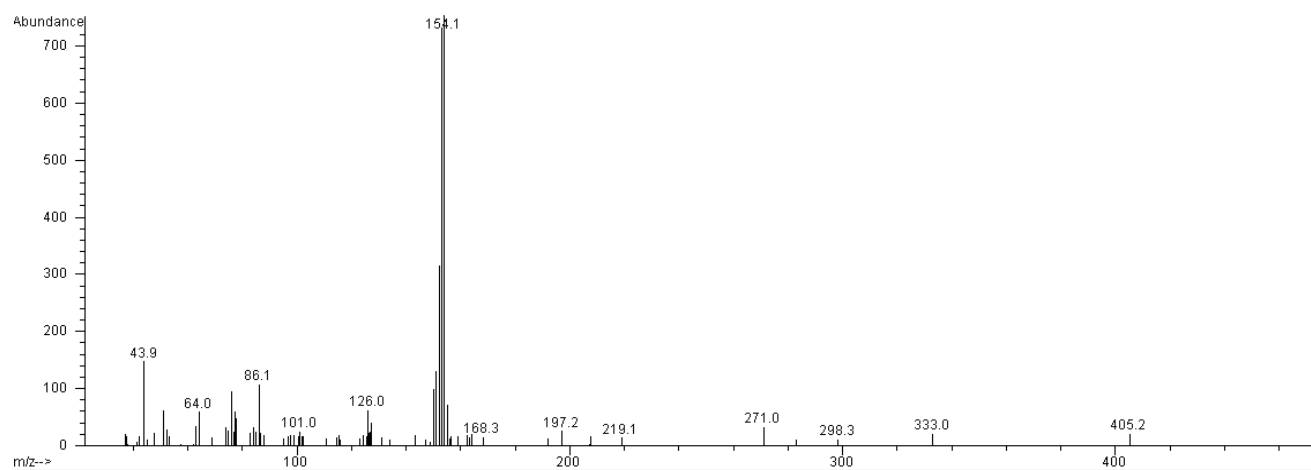


Figura A5. Espectro de masas del Acenafteno, peso molecular = 154 g mol⁻¹

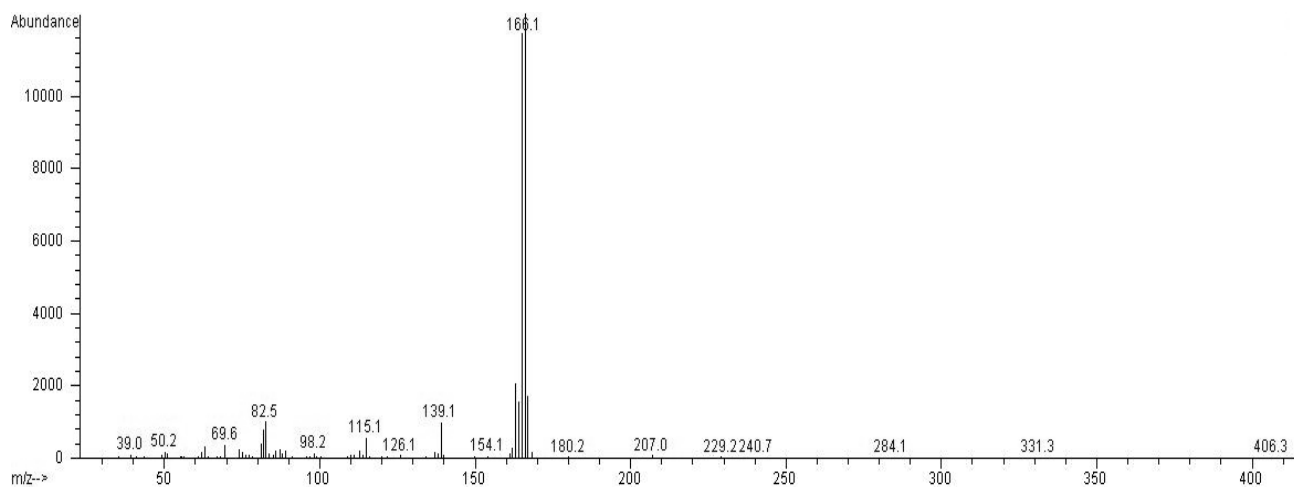


Figura A6. Espectro de masas del Fluoreno, peso molecular = 166 g mol⁻¹

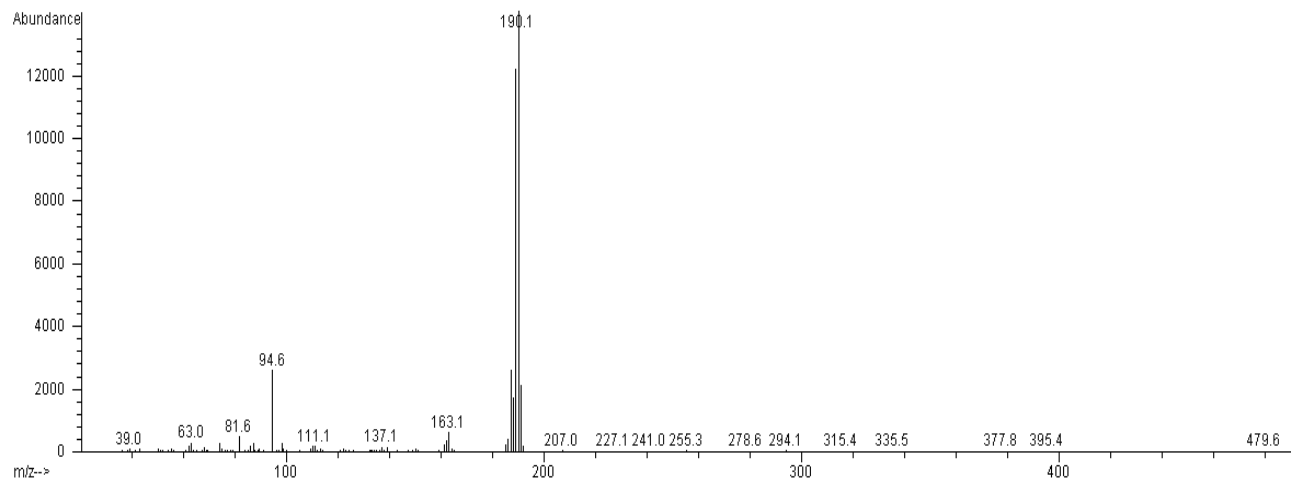


Figura A7. Espectro de masas del 4,5-Metilenfenantreno, peso molecular = 190 g mol⁻¹

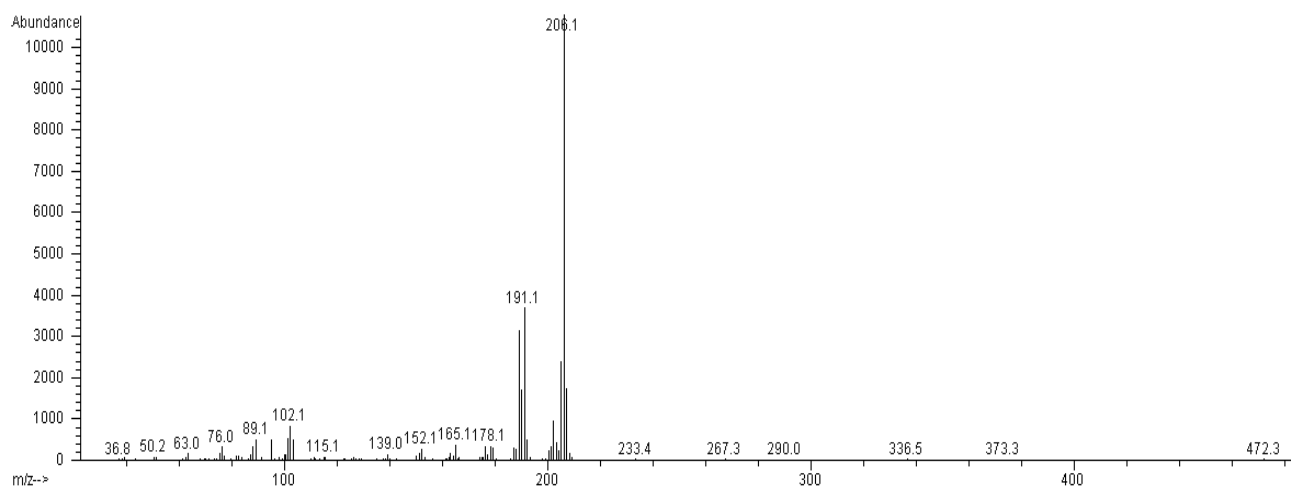


Figura A8. Espectro de masas del 3,6-Dimetilenfenantreno, peso molecular = 206 g mol⁻¹

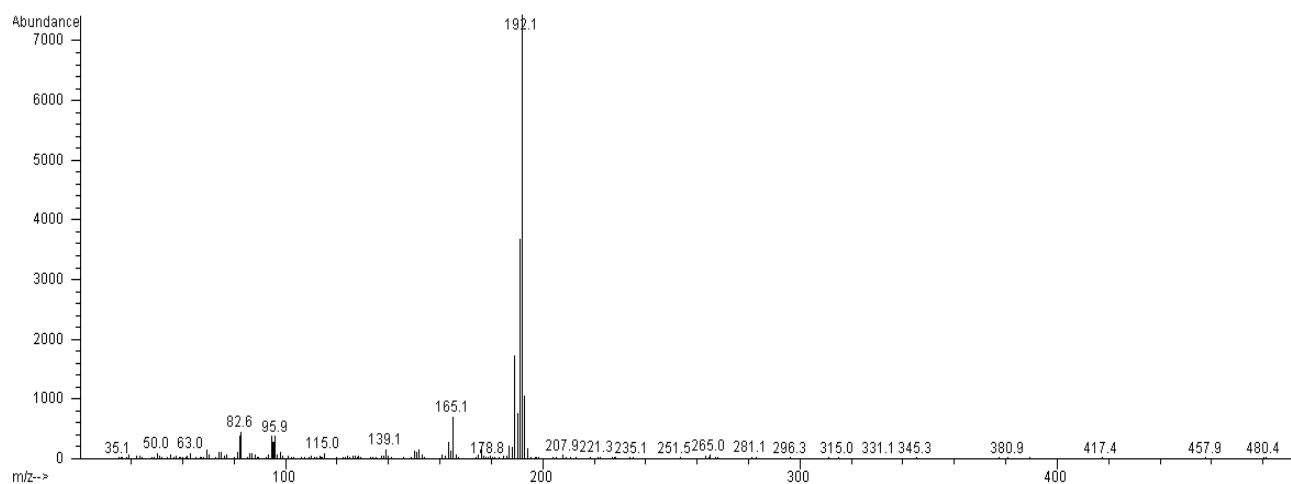


Figura A9. Espectro de masas del 1-Metilantraceno, peso molecular = 192 g mol⁻¹. Espectro similar para 2-Metilantraceno y 9-Metilantraceno

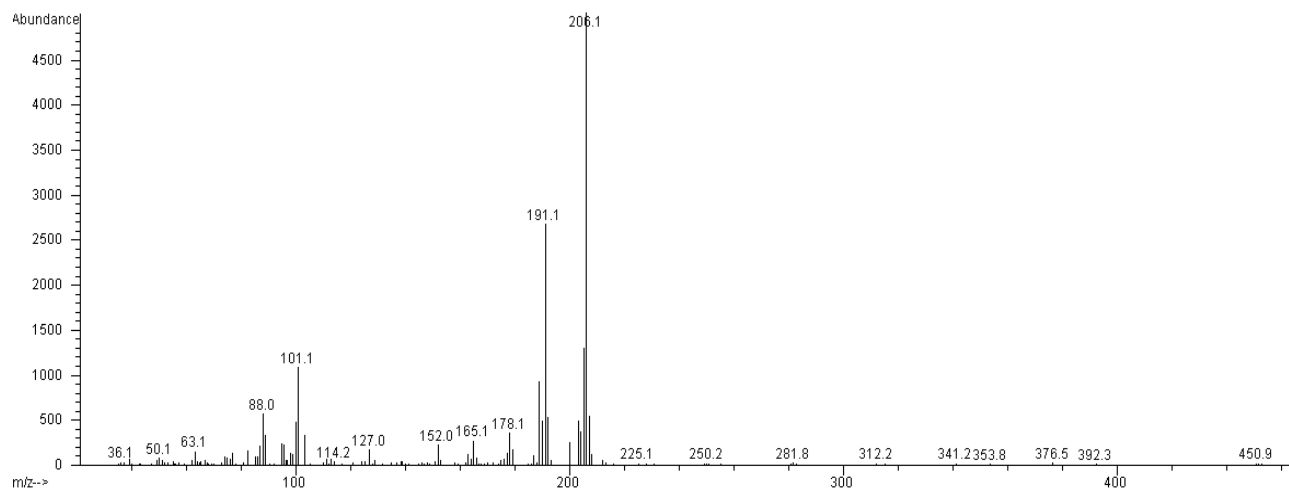


Figura A10. Espectro de masas del 9,10-Dimetilantraceno, peso molecular = 206 g mol⁻¹

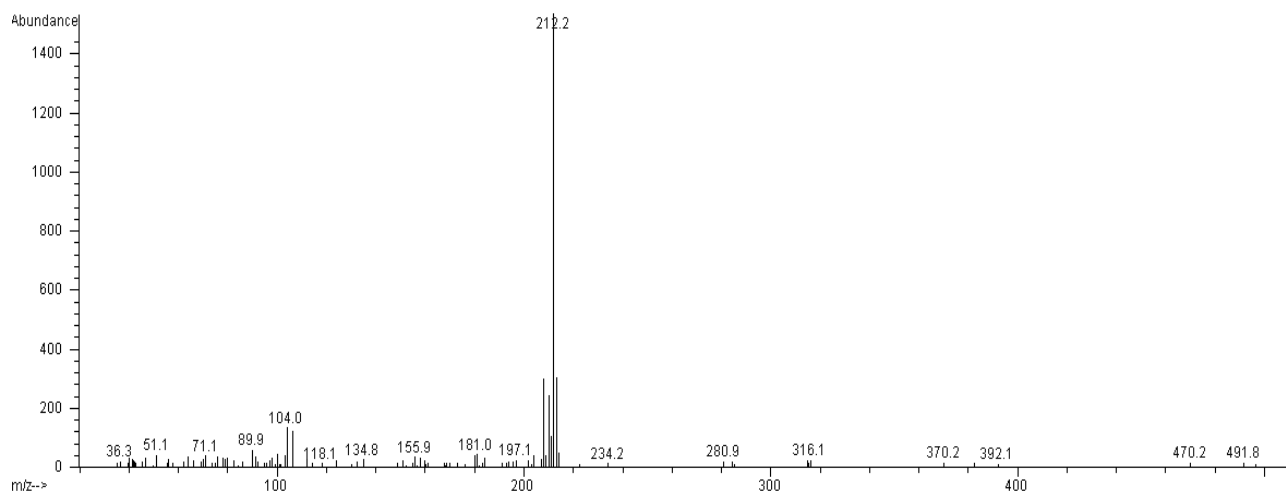


Figura A11. Espectro de masas del Pireno-d₁₀, peso molecular = 212 g mol⁻¹

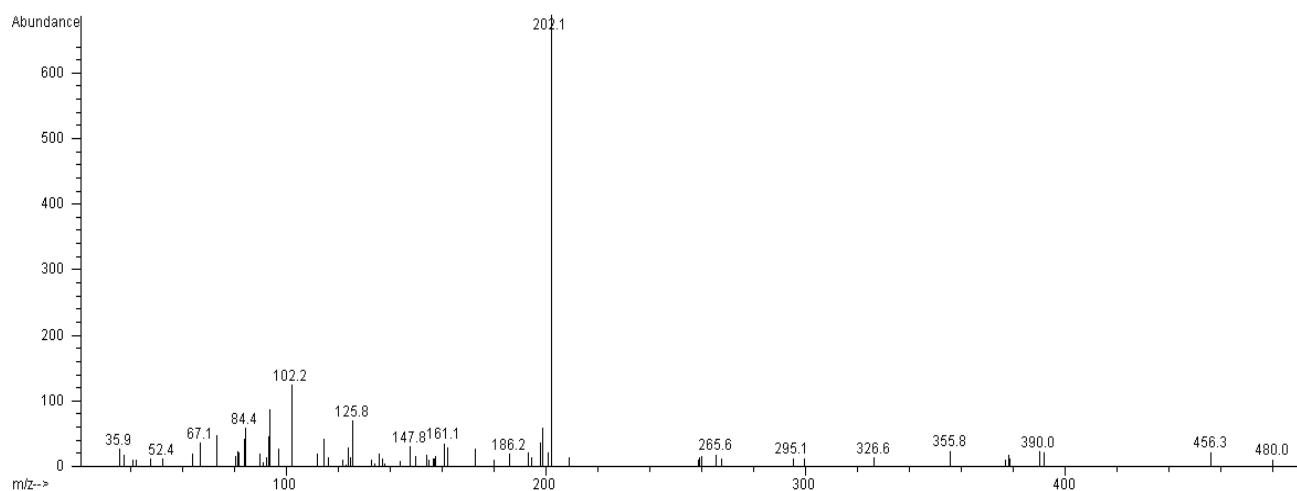


Figura A12. Espectro de masas del Pireno, peso molecular = 202 g mol⁻¹. Espectro similar para Fluoranteno

Apéndice A

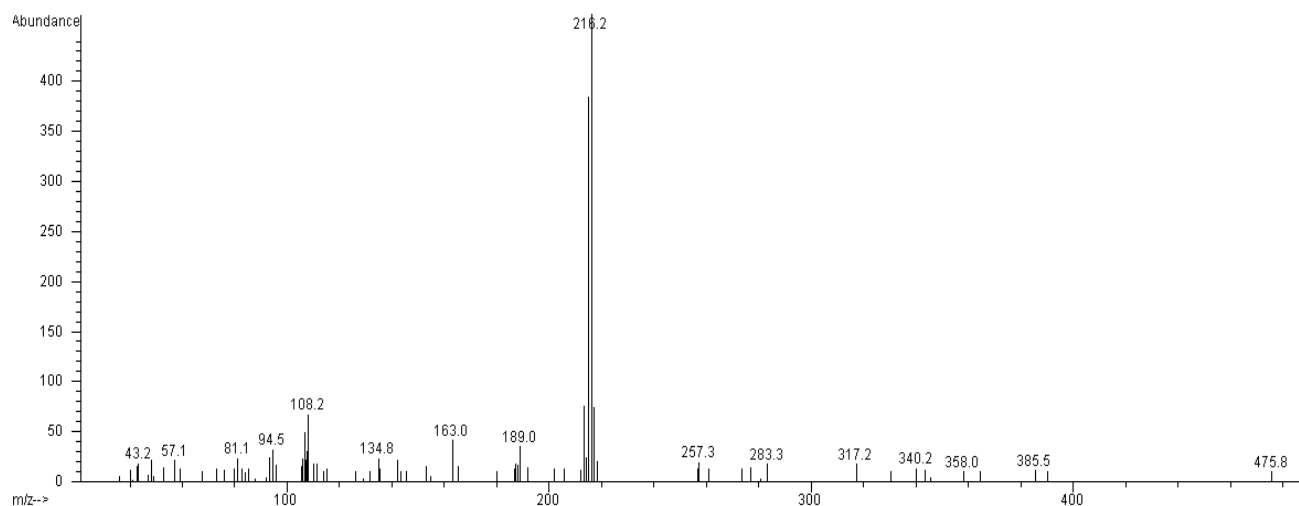


Figura A13. Espectro de masas del Benzo[a]fluoreno, peso molecular = 216 g mol⁻¹

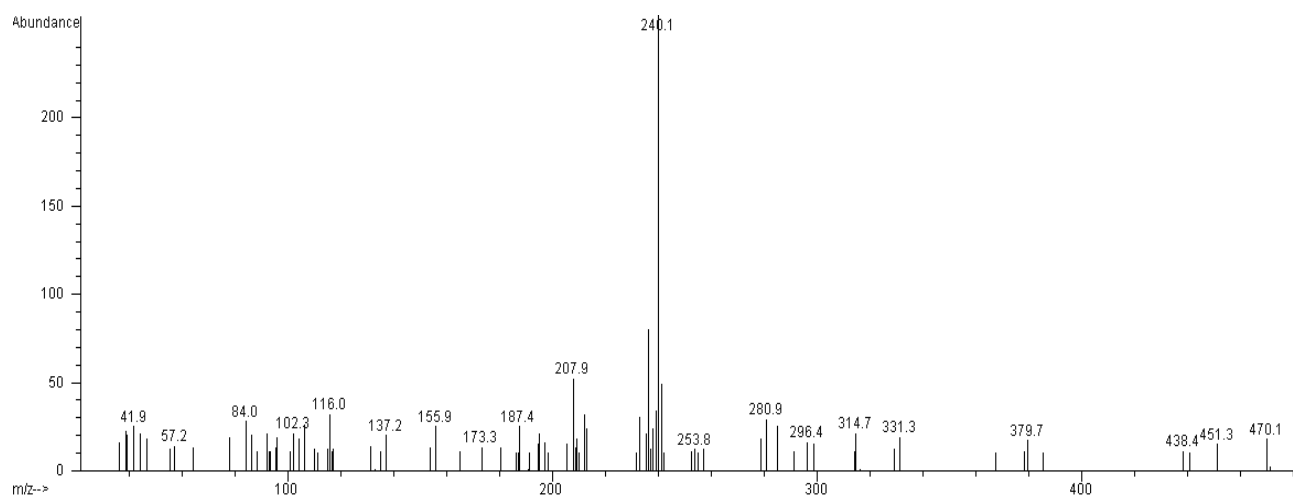


Figura A14. Espectro de masas del Benzo[a]antraceno-*d*₁₂, peso molecular = 240 g mol⁻¹. Espectro similar para Criseno-*d*₁₂

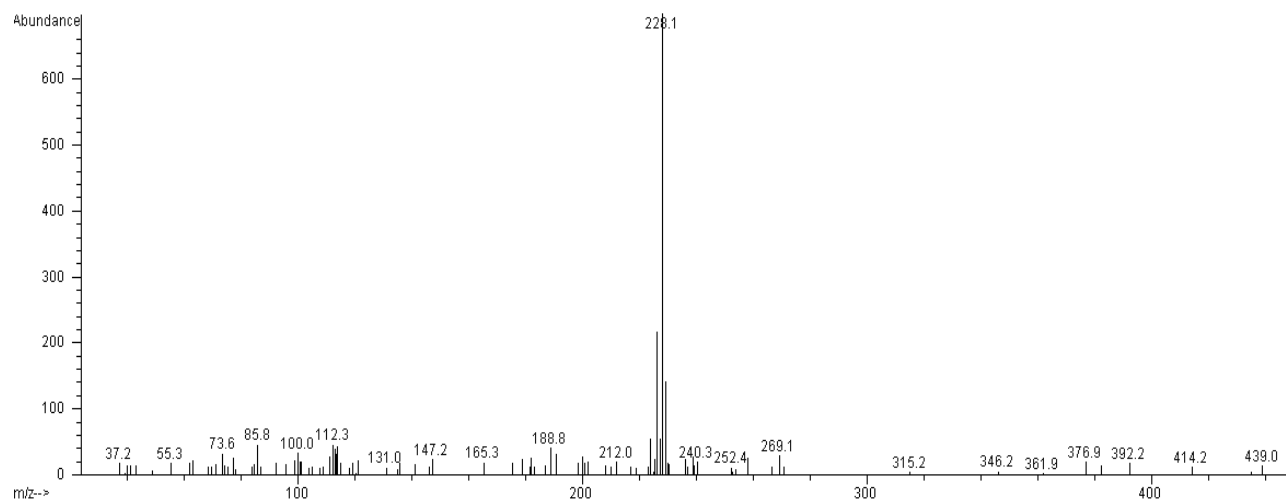


Figura A15. Espectro de masas del Benzo[a]antraceno, peso molecular = 228 g mol⁻¹. Espectro similar para Trifenileno y Criseno

Apéndice A

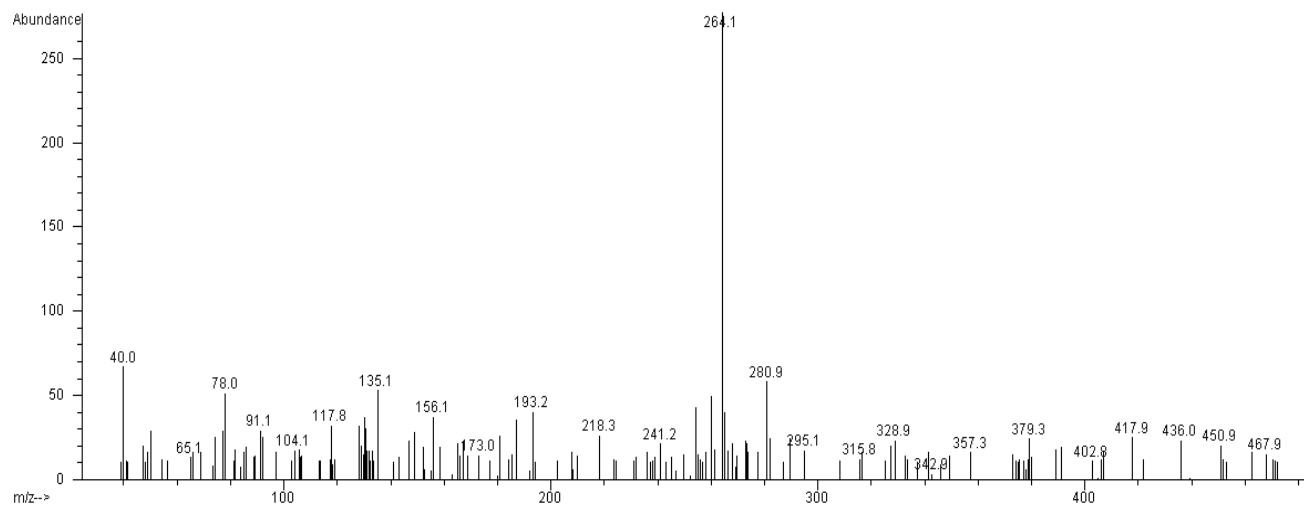


Figura A16. Espectro de masas del Benzo[b]fluoranteno- d_{12} , peso molecular = 264 g mol^{-1} .
Espectro similar para Benzo[k]fluoranteno- d_{12} , Benzo[a]pireno- d_{12} y Perileno- d_{12}

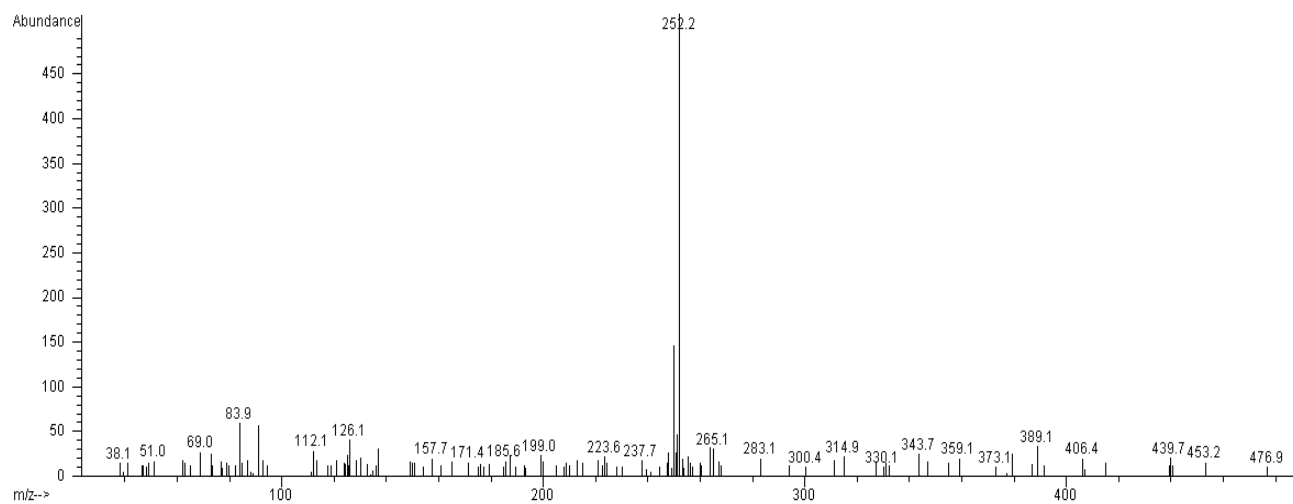


Figura A17. Espectro de masas del Benzo[b]fluoranteno, peso molecular = 252 g mol^{-1} .
Espectro similar para Benzo[k]fluoranteno, Benz[e]pireno, Benzo[a]pireno y Perileno

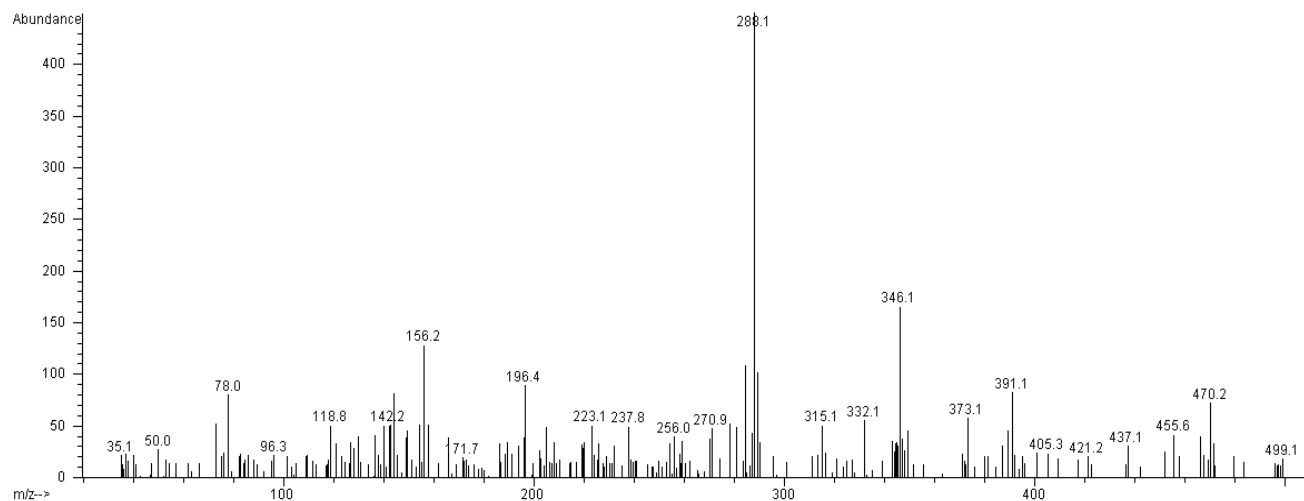


Figura A18. Espectro de masas del Benzo[ghi]perileno- d_{12} , peso molecular = 288 g mol^{-1}

Apéndice A

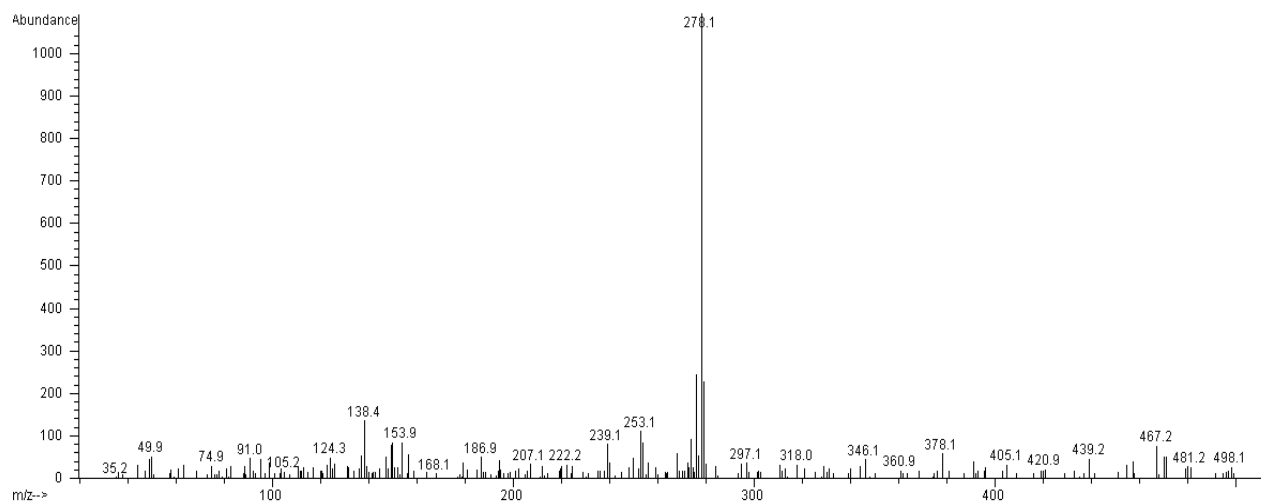


Figura A19. Espectro de masas del Dibenzo[*a,h*]antraceno, peso molecular = 278 g mol⁻¹.
Espectro similar para Dibenzo[*a,c*]antraceno)

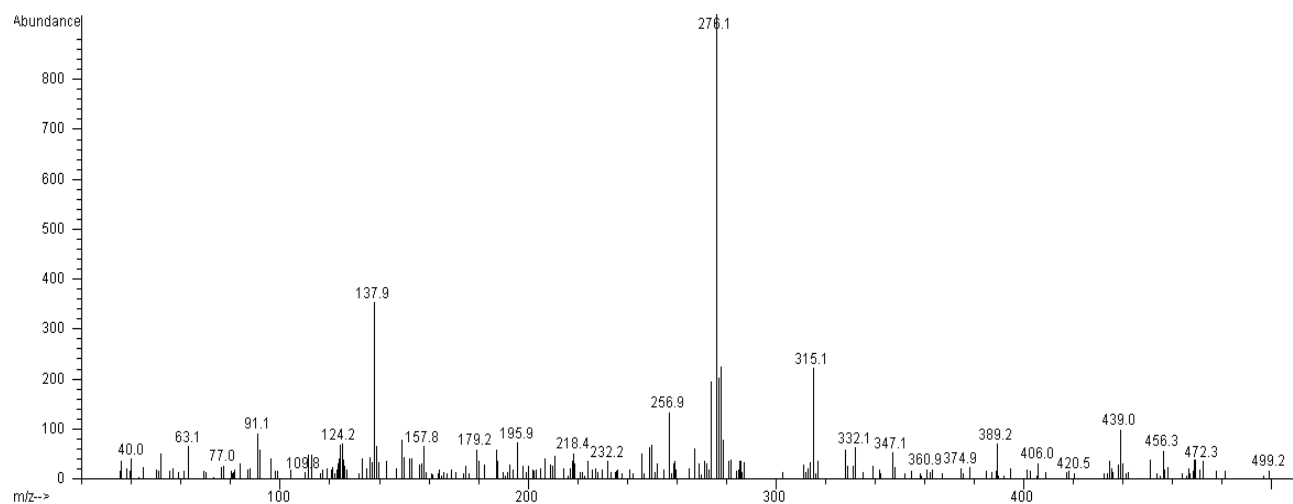


Figura A20. Espectro de masas del Indeno[1,2,3-*cd*]pireno peso molecular = 276 g mol⁻¹

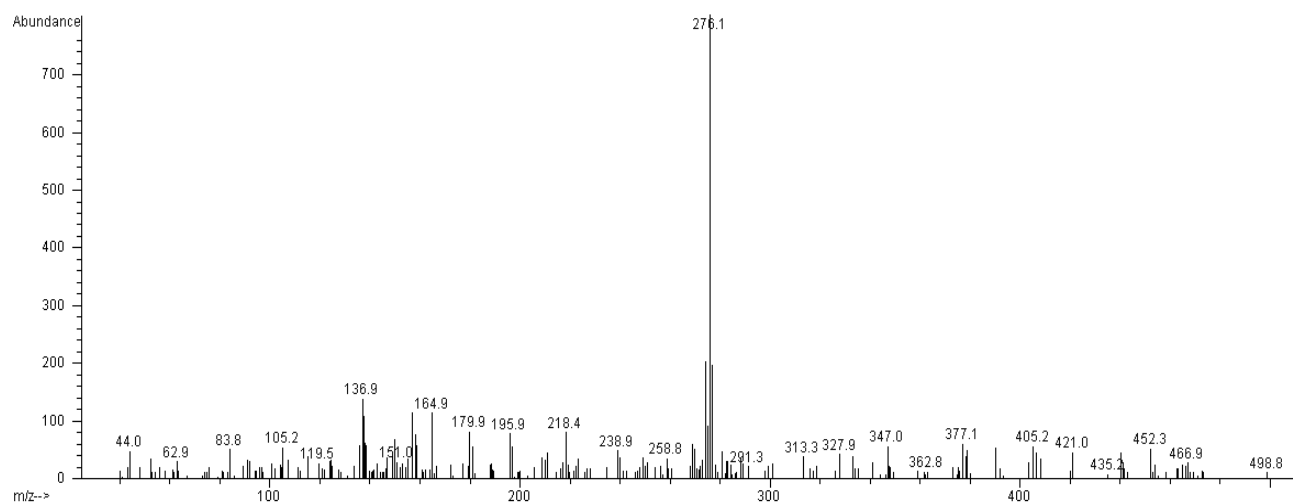


Figura A21. Espectro de masas del Benzo[*ghi*]perileno, peso molecular = 276 g mol⁻¹

Apéndice B

Verificación de la báscula

La báscula analítica utilizada fue de la marca Sartorius Analytic modelo A200S, sensibilidad de 0,1 mg y las pesas utilizadas para su verificación fueron de 1 mg y 20 mg clase E2.

Tabla B1. Verificación de la balanza antes para la preparación de las disoluciones.

Condiciones del cuarto de pesado		“Stock”	
Temperatura = 17.1 °C	Pesa 0.0010 g	Pesa 0.0200	
% Humedad relativa = 41	[g]	[g]	
Masa 1	0.0010	0.0200	
Masa 2	0.0010	0.0200	
Masa 3	0.0009	0.0199	
		Madre	
Temperatura = 16.6 °C	Pesa 0.0010 g	Pesa 0.0200	
% Humedad relativa = 33	[g]	[g]	
Masa 1	0.0008	0.0199	
Masa 2	0.0010	0.0200	
Masa 3	0.0010	0.0198	
		Trabajo	
Temperatura = 18.4°C	Pesa 0.0010 g	Pesa 0.0200	
% Humedad relativa = 29	[g]	[g]	
Masa 1	0.0010	0.0200	
Masa 2	0.0009	0.0200	
Masa 3	0.0011	0.0200	
		Fortificación	
Temperatura = 19.5°C	Pesa 0.0010 g	Pesa 0.0200	
% Humedad relativa = 34	[g]	[g]	
Masa 1	0.0009	0.0201	
Masa 2	0.0010	0.0200	
Masa 3	0.0010	0.0201	

Apéndice C

Curvas instrumentales

En el intervalo de concentraciones altas, además del fenantreno, los HAP más abundantes en las muestras fueron el 1-metilantraceno ($r^2 = 0.9998$) (figura C1 y tabla C I) y el pireno, que es uno de los compuestos marcadores de las emisiones de diesel y biodiesel ($r^2 = 0.9985$) (figura C2 y tabla C II)

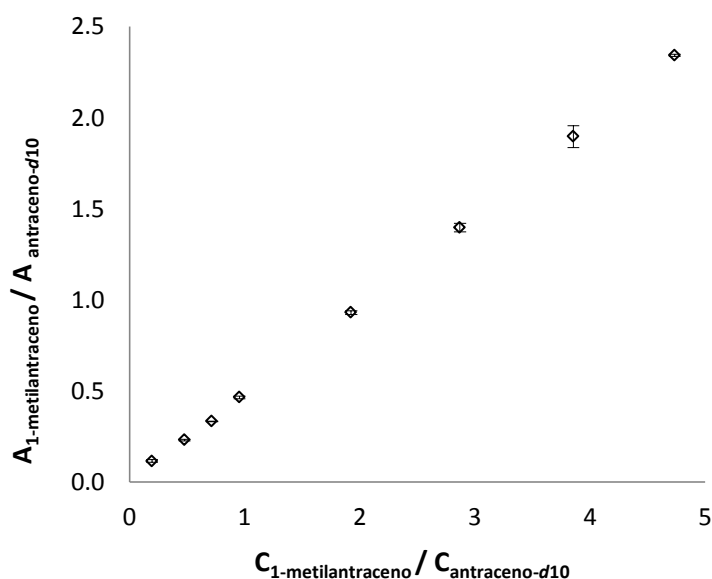


Tabla C I. Curva de calibración instrumental del 1-metilantraceno

Nivel	[ng mL ⁻¹]	Cr	Ar promedio
1	900.0	4.74	2.3416
2	732.4	3.85	1.8952
3	545.4	2.87	1.3951
4	365.7	1.92	0.9303
5	181.5	0.96	0.4645
6	136.0	0.72	0.3332
7	91.0	0.48	0.2302
8	36.9	0.19	0.1154

Masa del antraceno-*d*₁₀ = 190 ng

Figura C1. Curva de calibración instrumental del 1-metilantraceno

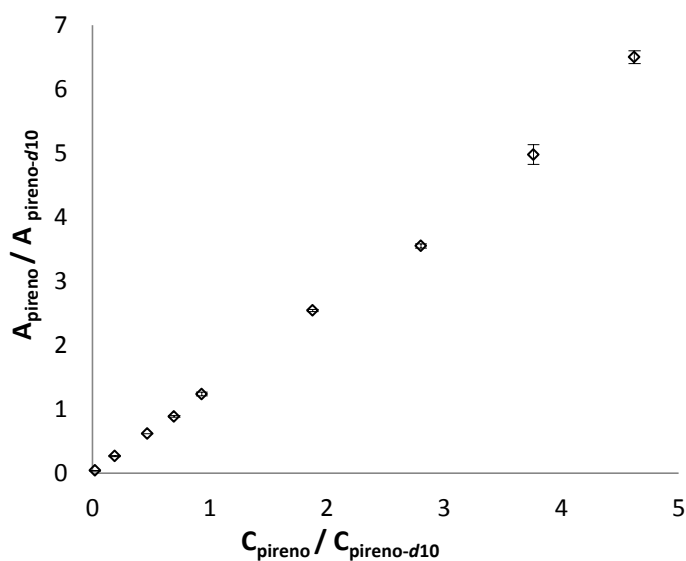


Tabla C II. Curva de calibración instrumental del pireno

Nivel	[ng mL ⁻¹]	Cr	Ar promedio
1	891.1	4.624	6.5017
2	725.2	3.763	4.9750
3	540.0	2.802	3.5513
4	362.1	1.879	2.5360
5	179.7	0.932	1.2340
6	134.6	0.699	0.8845
7	90.1	0.467	0.6143
8	36.6	0.190	0.2675

Masa del pireno-*d*₁₀ = 192.7 ng

Figura C2. Curva de calibración instrumental del pireno

En el intervalo de concentraciones bajas, los HAP con mayor masa encontrada en las muestras fueron el benzo[a]antraceno ($r^2 = 0.9987$) (figura C3 y tabla C III), y la suma de trifenileno y criseno ($r^2 = 0.9977$) (figura C4 y tabla C IV).

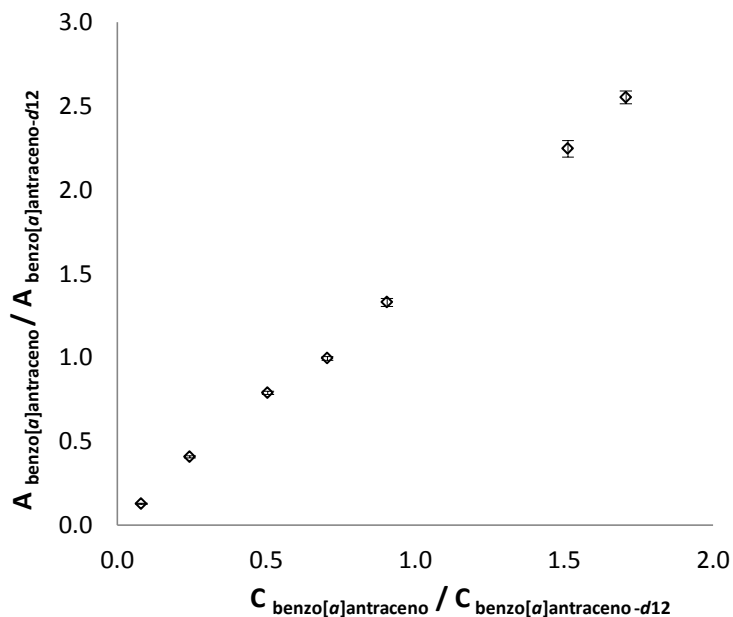


Tabla C III. Curva de calibración instrumental del benzo[a]antraceno

Nivel	[ng mL ⁻¹]	Cr	Ar promedio
1	103.6	1.71	2.5514
2	91.8	1.51	2.2441
5	54.9	0.91	1.3279
6	42.8	0.71	0.9938
7	30.7	0.51	0.7881
8	14.8	0.24	0.4059
9	4.9	0.08	0.1270

Masa del benzo[a]antraceno -d₁₂ = 60.7 ng

Figura C3. Curva de calibración instrumental del benzo[a]antraceno

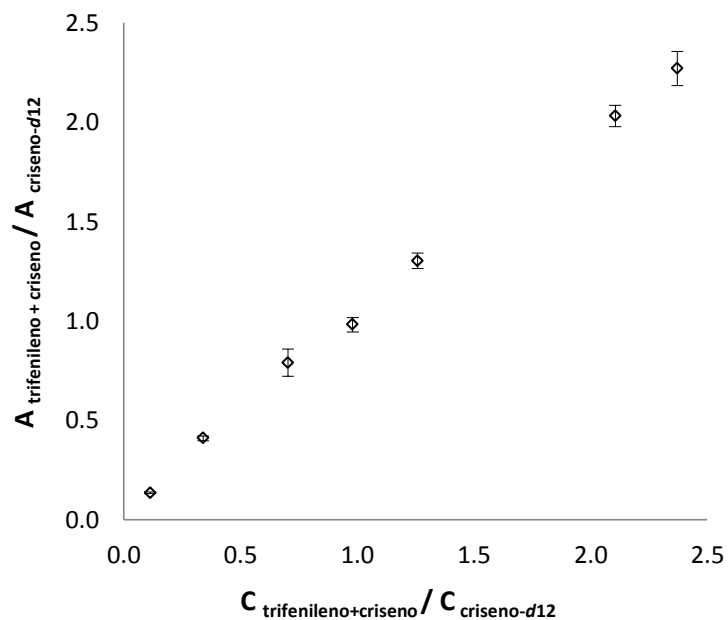


Tabla C IV. Curva de calibración instrumental del trifenileno+criseno

Nivel	[ng mL ⁻¹]	Cr	Ar promedio
1	87.5	2.37	2.2697
2	77.7	2.10	2.0295
5	46.4	1.26	1.3013
6	36.2	0.98	0.9812
7	25.9	0.70	0.7900
8	12.5	0.34	0.4098
9	4.1	0.11	0.1347

Masa del criseno-d₁₂ = 36.9 ng

Figura C4. Curva de calibración instrumental del trifenileno+criseno

Apéndice D

Curvas de método

En el intervalo de concentraciones altas, después del fenantreno, los compuestos encontrados con mayor abundancia en las muestras fueron el pireno ($r^2 = 0.9946$) (figura D1 y tabla D I) y el 1-metilantraceno ($r^2 = 0.9937$) (figura D2 y tabla D II).

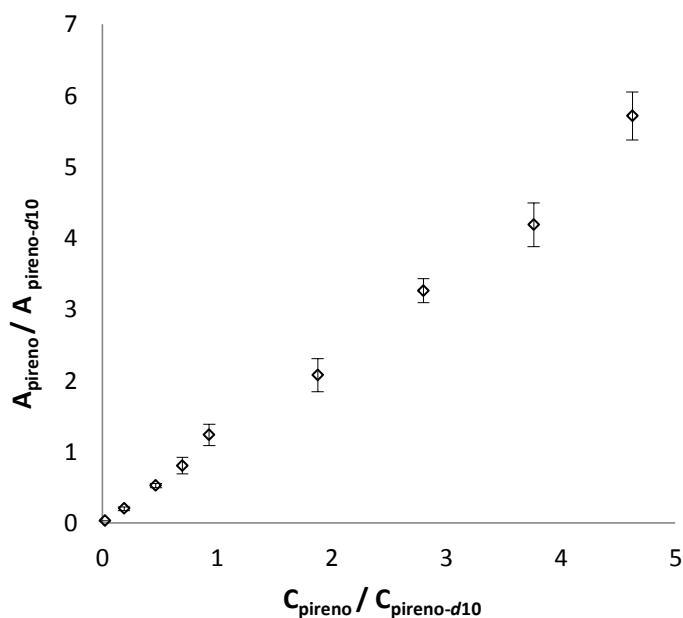


Figura D1. Curva de calibración de método del pireno

Tabla D I. Curva de calibración de método del pireno

Nivel	[ng mL ⁻¹]	Cr	Ar promedio
1	891.1	4.62	5.5840
2	725.2	3.76	3.8668
3	540.0	2.80	3.1626
4	362.1	1.88	1.8381
5	179.7	0.93	1.0997
6	134.6	0.70	0.8078
7	90.1	0.47	0.5620
8	36.6	0.19	0.2164

Masa del pireno- d_{10} = 192.7 ng

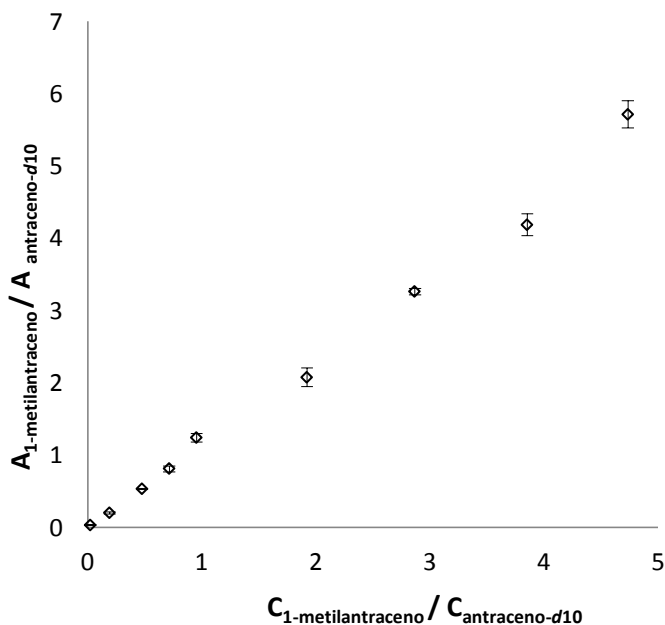


Figura D2. Curva de calibración de método del 1-metilantraceno

Tabla D II. Curva de calibración de método Del 1-metilantraceno

Nivel	[ng mL ⁻¹]	Cr	Ar promedio
1	900.0	4.74	2.2390
2	732.4	3.85	1.6661
3	545.4	2.87	1.3869
4	365.7	1.92	0.8439
5	181.5	0.96	0.5393
6	136.0	0.72	0.3424
7	91.0	0.48	0.1994
8	36.9	0.19	0.0857

Masa del antraceno- d_{10} = 190 ng

En el intervalo de concentraciones bajas, los HAP con la mayor masa encontrada en las muestras fueron el benzo[a]antraceno ($r^2 = 0.9819$) (figura D3 y tabla D III) y la suma de trifenileno y criseno ($r^2 = 0.9762$) (figura D4 y tabla D IV).

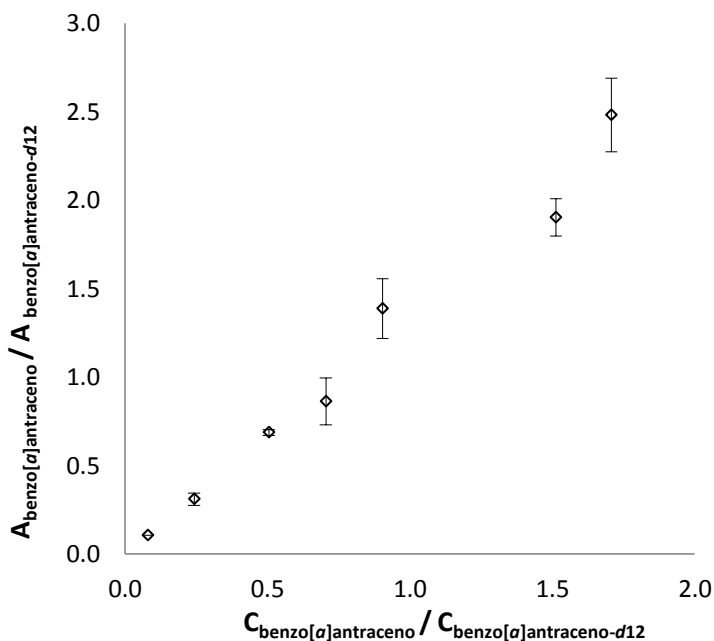


Tabla D III. Curva de calibración de método del benzo[a]antraceno

Nivel	[ng mL ⁻¹]	Cr	Ar promedio
1	103.6	1.71	2.4801
2	91.8	1.51	1.9019
5	54.9	0.91	1.3874
6	42.8	0.71	0.8624
7	30.7	0.51	0.6871
8	14.8	0.24	0.3103
9	4.9	0.08	0.1065

Masa del benzo[a]antraceno -d₁₂ = 60.7 ng

Figura D3. Curva de calibración de método del benzo[a]antraceno

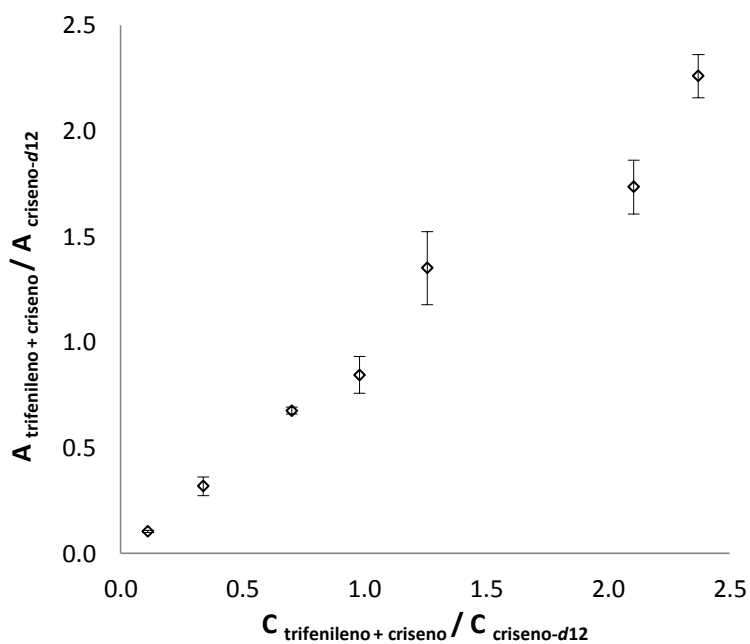


Tabla D IV. Curva de calibración de método del trifenileno+ criseno

Nivel	[ng mL ⁻¹]	Cr	Ar promedio
1	87.5	2.37	2.2582
2	77.7	2.10	1.7333
5	46.4	1.26	1.3496
6	36.2	0.98	0.8444
7	25.9	0.70	0.6758
8	12.5	0.34	0.3178
9	4.1	0.11	0.1048

Masa del criseno-d₁₂ = 36.9 ng

Figura D4. Curva de calibración de método del trifenileno + criseno

Apéndice E

Precisión de las curvas de calibración instrumentales y de método

En la tabla EI se muestran los porcentajes de los coeficientes de variación (CV) en cada uno de los 9 niveles de las curvas de calibración instrumentales, mientras que en la tabla E II se encuentran los correspondientes a las curvas de calibración del método.

Tabla E I . Precisión por nivel de las curvas de calibración instrumentales CV- Coeficientes de variación en %.

HAP	CV ₁	CV ₂	CV ₃	CV ₄	CV ₅	CV ₆	CV ₇	CV ₈	CV ₉
Naftaleno	1.9	2.7	1.5	0.3	0.6	2.3	0.9	0.3	2.9
Acenaftileno	1.2	1.9	-----	-----	0.4	0.4	2.5	2.6	10.6
Acenafteno	2.0	4.4	-----	-----	1.4	1.4	3.5	0.4	2.9
Fluoreno	1.2	1.2	1.0	0.3	1.1	0.1	1.1	2.8	4.6
Fenantreno	1.1	4.3	0.8	0.9	0.2	0.2	0.7	1.1	2.7
4,5-Metilenfenantreno	0.8	0.9	0.9	1.7	0.7	1.8	2.9	1.3	8.3
3,6-Dimetilfenantreno	0.9	3.4	0.7	0.4	1.3	1.0	1.6	2.0	12.1
Antraceno	1.1	2.0	1.3	0.7	2.0	2.6	0.6	3.2	5.1
2-Metilantraceno	0.6	0.4	2.1	1.2	1.0	1.0	2.2	1.9	-----
1-Metilantraceno	0.3	3.2	1.7	1.1	1.7	0.4	1.8	5.6	-----
9-Metilantraceno	1.6	0.3	2.4	0.6	1.7	0.9	1.8	2.0	-----
Fluoranteno	0.8	1.0	1.9	1.4	1.2	1.4	2.3	2.3	7.0
9,10-Dimetilantraceno	2.8	3.9	0.7	1.6	0.8	3.2	1.3	2.4	-----
Pireno	1.5	3.1	0.9	0.6	2.4	1.1	0.6	3.2	4.0
Tripticeno	3.1	2.4	-----	-----	0.5	7.9	2.9	7.9	2.1
Benzo[a]fluoreno	0.1	6.1	-----	-----	1.2	0.6	5.4	1.6	12.8
Benzo[a]antraceno	1.5	2.2	-----	-----	1.7	1.2	1.1	1.5	1.9
Trifenileno+Criseno	3.8	2.6	-----	-----	3.0	3.7	8.7	2.9	3.3
Benzo[b]fluoranteno	2.2	1.2	-----	-----	1.7	1.2	0.7	5.9	2.9
7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno	1.7	2.1	-----	-----	2.8	3.2	4.5	3.1	6.7
Benzo[k]fluoranteno	2.5	3.5	-----	-----	4.7	3.4	10.0	4.3	10.0
Benzo[e]pireno	1.2	0.9	-----	-----	0.6	1.2	0.9	3.2	0.8
Benzo[a]pireno	0.9	1.1	-----	-----	2.8	2.5	1.1	3.0	5.6
Perileno	0.7	2.1	-----	-----	3.4	1.9	0.9	3.2	0.8
Dibenzo[a,c]antraceno	0.8	1.1	-----	-----	2.8	2.5	1.5	1.0	3.3
Indeno[1,2,3-cd]pireno	3.5	1.7	-----	-----	1.9	2.4	1.4	6.5	10.4
Dibenzo[a,h]antraceno	13.6	2.7	-----	-----	3.5	2.1	2.7	9.6	3.4
Benzo[ghi]perileno	0.3	1.4	-----	-----	2.5	3.5	0.9	2.0	11.3

En general, se observó que el nivel 9 presentó los CV más altos debido a que es la cantidad menor de HAP adicionada.

Tabla E II . Precisión por nivel de las curvas de calibración de método. CV- Coeficientes de variación en %.

HAP	CV ₁	CV ₂	CV ₃	CV ₄	CV ₅	CV ₆	CV ₇	CV ₈	CV ₉
Naftaleno	7.2	5.6	8.5	11.6	14.3	7.1	8.9	10.3	3.7
Acenaftileno	7.6	5.6	-----	-----	13.6	4.1	4.5	12.7	5.9
Acenafteno	7.7	4.3	-----	-----	14.8	2.0	7.6	13.3	2.5
Fluoreno	6.1	5.3	3.7	13.5	14.5	10.5	8.9	9.9	8.4
Fenantreno	7.1	8.0	4.7	14.4	13.6	11.6	5.3	11.6	-----
4,5-Metilenfenantreno	7.6	8.7	4.0	14.8	11.8	10.9	4.9	11.0	-----
3,6-Dimetilfenantreno	6.7	9.9	3.6	15.3	13.5	12.6	3.1	8.6	10.1
Antraceno	7.4	7.9	2.9	14.5	11.9	11.9	8.4	9.0	8.6
2-Metilantraceno	6.6	8.5	2.9	17.9	12.4	12.5	5.5	10.4	12.9
1-Metilantraceno	8.4	9.0	3.3	15.0	10.8	12.6	3.9	16.6	4.3
9-Metilantraceno	7.2	9.3	2.4	14.0	13.6	12.9	6.2	12.6	-----
Fluoranteno	7.8	7.1	5.9	10.3	10.2	12.9	4.5	12.1	9.4
9,10-Dimetilantraceno	4.6	6.1	4.4	5.9	23.1	14.1	3.3	14.1	-----
Pireno	5.9	7.3	5.2	11.2	12.1	14.0	5.2	12.5	6.5
Tripticeno	5.7	10.0	-----	-----	11.1	16.9	2.9	11.8	1.6
Benzo[a]fluoreno	8.3	5.2	-----	-----	13.5	14.6	1.8	12.8	2.1
Benzo[a]antraceno	8.4	5.5	-----	-----	12.2	15.4	2.5	11.2	1.1
Trifenileno+Criseno	4.6	7.3	-----	-----	12.8	10.3	2.4	13.8	5.3
Benzo[b]fluoranteno	4.3	6.1	-----	-----	13.1	14.0	1.6	10.4	1.9
7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno	6.4	5.0	-----	-----	16.3	12.7	3.4	12.6	5.5
Benzo[k]fluoranteno	7.8	6.2	-----	-----	12.6	12.0	3.9	12.6	2.7
Benzo[e]pireno	6.8	5.8	-----	-----	12.4	14.2	1.3	11.2	1.3
Benzo[a]pireno	7.2	7.5	-----	-----	12.1	13.8	2.0	10.7	2.3
Perileno	6.3	7.2	-----	-----	12.2	13.3	1.3	11.6	3.4
Dibenzo[a,c]antraceno	18.5	17.1	-----	-----	13.3	15.0	2.8	13.0	-----
Indeno[1,2,3-cd]pireno	7.1	7.7	-----	-----	13.0	13.5	3.4	10.6	4.6
Dibenzo[a,h]antraceno	7.5	8.9	-----	-----	13.1	13.0	2.8	13.7	12.3
Benzo[ghi]perileno	6.0	6.7	-----	-----	13.4	13.7	4.3	13.5	1.0

Es notable que las curvas de método presentan mayores coeficientes de variación con respecto a las instrumentales, esto debido a que en las últimas está incluida la variabilidad experimental de todo el proceso de extracción, mientras que los CV instrumentales sólo reflejan la variación debida al cromatógrafo acoplado al espectrómetro de masas.

La precisión en todo el intervalo, es decir, el CV involucrando todos los niveles de las curvas de calibración instrumentales y de método se muestra en la tabla E III.

Tabla E III . Precisión en todo el intervalo de las curvas de calibración. CV- Coeficientes de variación en %.

HAP	Curva Instrumental	Curva de método
	CV _{total}	CV _{total}
Naftaleno	9.0	10.8
Acenaftileno	7.4	10.2
Acenafteno	13.5	11.8
Fluoreno	8.4	10.1
Fenantreno	10.4	10.2
4,5-Metilenfenantreno	5.5	8.2
3,6-Dimetilfenantreno	5.9	11.3
Antraceno	6.2	9.0
2-Metilantraceno	11.6	14.6
1-Metilantraceno	8.0	9.5
9-Metilantraceno	4.4	12.3
Fluoranteno	10.4	11.5
9,10-Dimetilantraceno	18.8	18.3
Pireno	6.0	8.5
Tripticeno	27.7	9.6
Benzo[a]fluoreno	9.9	9.3
Benzo[a]antraceno	5.5	8.4
Trifenileno+Criseno	10.0	8.5
Benzo[b]fluoranteno	6.2	7.6
7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno	28.3	18.7
Benzo[k]fluoranteno	13.8	7.1
Benzo[e]pireno	8.9	7.2
Benzo[a]pireno	9.9	7.9
Perileno	5.1	7.4
Dibenzo[a,c]antraceno	4.6	19.5
Indeno[1,2,3-cd]pireno	4.6	9.4
Dibenzo[a,h]antraceno	5.9	9.0
Benzo[ghi]perileno	6.5	7.3

Apéndice F

Eficiencias por adiciones patrón

La figura F1 muestra las recuperaciones del acenaftileno, compuesto calibrado en el intervalo de concentraciones bajas y donde se observó independencia de la recuperación con respecto a la masa. Los HAP calibrados en este intervalo que siguen este comportamiento son: acenafteno, triptíceno, benzo[a]fluoreno, benzo[a]antraceno, trifenileno y criseno, benzo[b]fluoranteno.

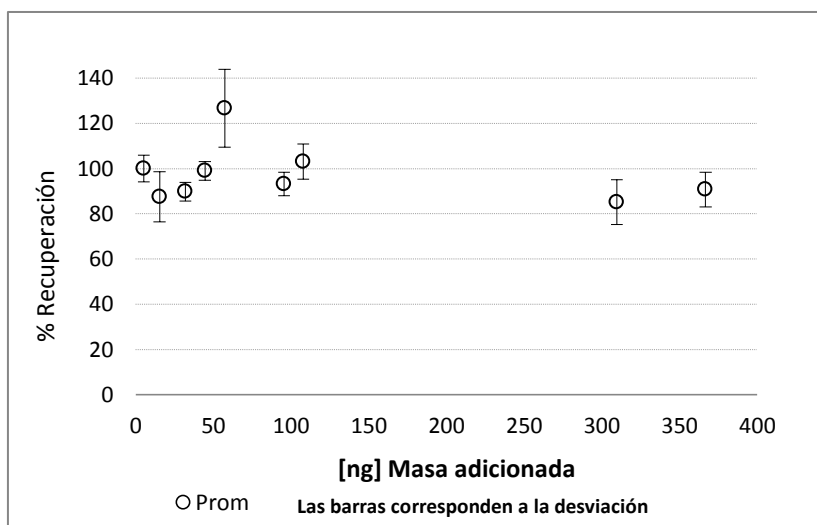


Figura F1. Recuperaciones del acenaftileno en los 9 niveles de calibración

De manera similar los HAP calibrados en el intervalo de concentraciones altas, en los que la eficiencia permaneció constante en todo el intervalo de calibración fueron el pireno (figura F2) y el 2-metilantraceno.

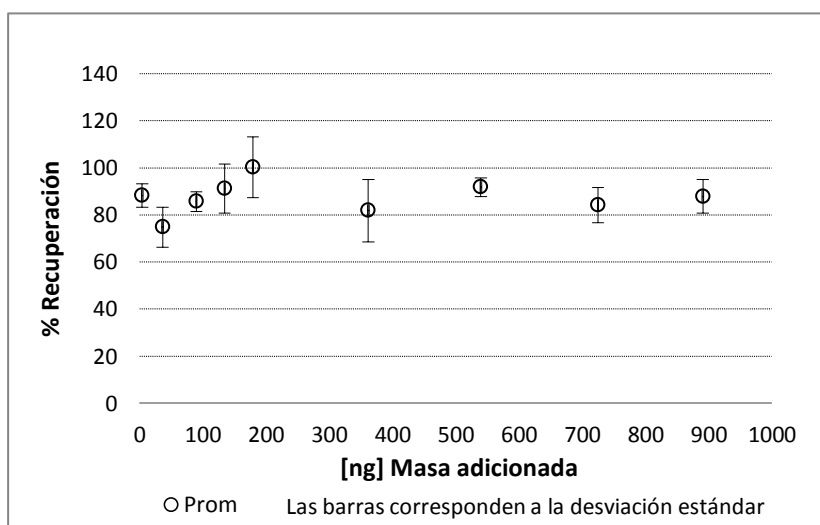


Figura F2. Recuperaciones del pireno en los 9 niveles de calibración

Por otra parte, los HAP calibrados en concentraciones bajas donde se observó dependencia de la eficiencia en función de la masa en los niveles de menor concentración (5 al 9) fueron: benzo[*k*]fluoranteno (figura F3), benzo[*e*]pireno, benzo[*a*]pireno, perileno, indeno[1,2,3-*cd*]pireno y benzo[*ghi*]perileno, mientras que los HAP calibrados a concentraciones altas que presentaron este comportamiento fueron: naftaleno, fluoreno, fenantreno, 4,5-metilfenantreno, 3,6-dimetilfenantreno, antraceno, 1-metilantraceno, 9-metilantraceno (figura F4), y fluoranteno.

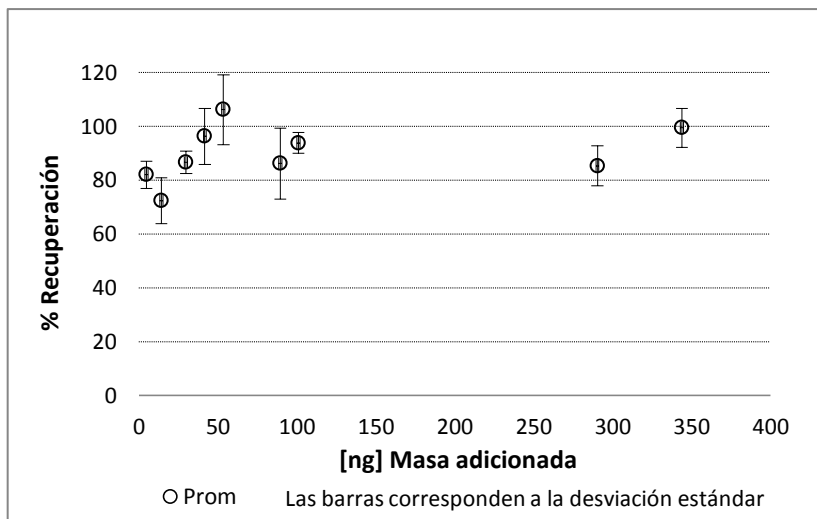


Figura F3. Recuperaciones del benzo[*k*]fluoranteno en los 9 niveles de calibración

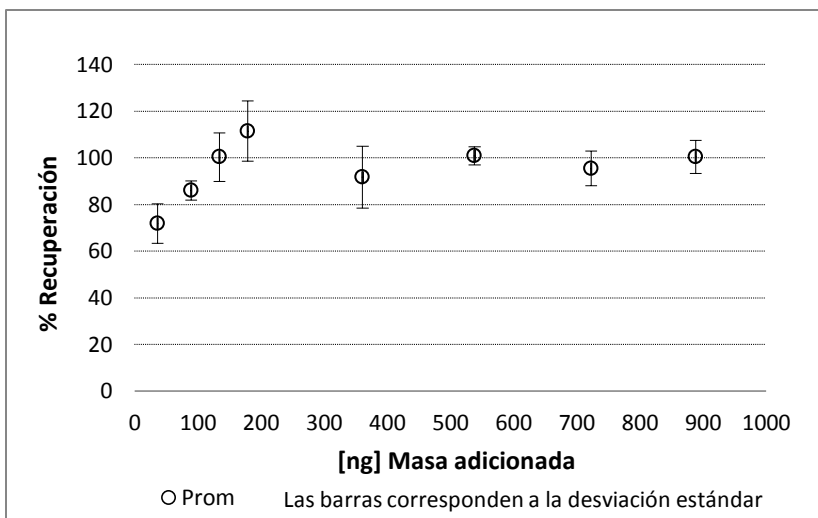


Figura F4. Recuperaciones del 9-metilantraceno en los 8 niveles de calibración.

El dibenzo[*a,h*]antraceno fue el único compuesto en el cual se observó dependencia de la recuperación en función de la masa a lo largo de todo el intervalo de calibración (figura F5), aunque es importante mencionar que la pendiente fue de 0.044

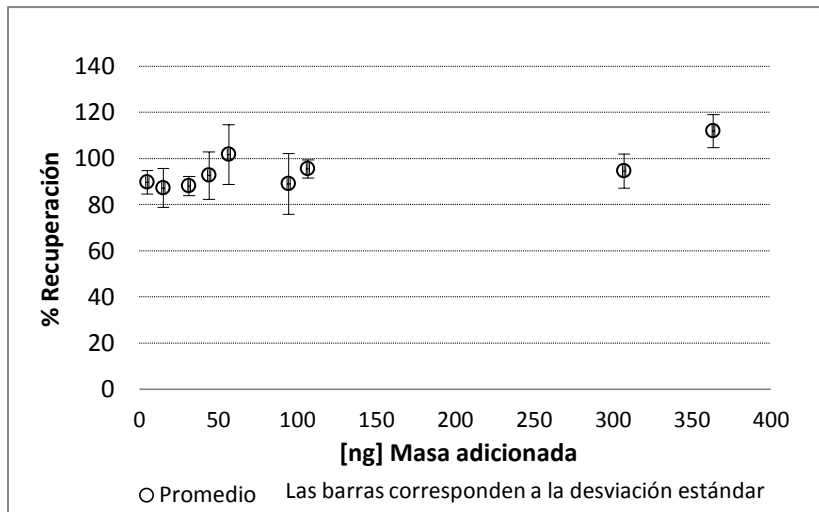


Figura F5. Recuperaciones del dibenzo[a,h]antraceno en los 9 niveles de calibración.

El 9,10-dimetilantraceno (figura F6) y el dibenzo[a,c]antraceno (figura F7) presentaron una tendencia diferente, en la que la dependencia de la eficiencia en función de la masa fue en los niveles de mayor concentración (1 al 5), mientras que para los niveles inferiores el porcentaje de recuperación permaneció constante.

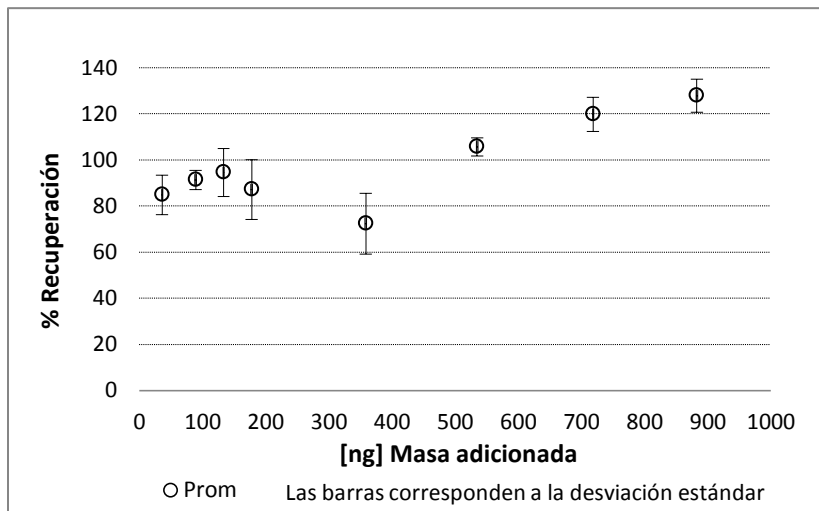


Figura F6. Recuperaciones del 9,10-dimetilantraceno en los 9 niveles de calibración.

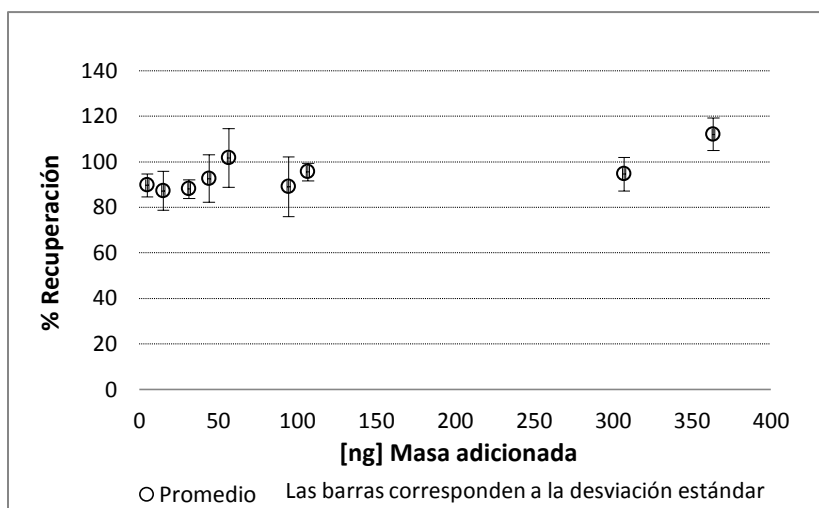


Figura F7. Recuperaciones del dibenzo[*a,h*]antraceno en los 9 niveles de calibración.