



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

**Desarrollo y comparación de dos métodos analíticos para la extracción y  
purificación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's) en  
muestras biológicas**

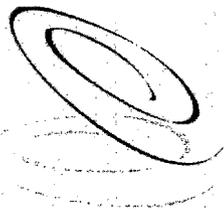
INFORME DE TRABAJO  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. A. CLAUDIA LUIS AGUIRRE



QUÍMICA  
D.E.P.H.



**Ciencias  
Químicas**

TUTOR: Dra. ARACELI PEÑA ALVAREZ

AÑO: 2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por la maravillosa experiencia que ha sido pertenecer a esta institución

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. Registro 181741 y a la Dirección General de Estudios de Posgrado por el apoyo económico otorgado

A la Dra, Araceli Peña por darme la oportunidad de trabajar con ella y confiar en mi

A la M. en C. Carmen Labastida por su amabilidad y sabios consejos

A los profesores Silvia Mendoza, Adolfo García y Ernestina Cervera por su amistad durante todo este proceso.

A mi familia porque sin su ayuda y apoyo esto no habría sido posible

A Francisco Valdés por la comprensión y el cariño que me ha brindado durante todo este tiempo

A mis amigos y compañeros de laboratorio por todos los momentos que compartimos y los buenos deseos

El presente trabajo se realizó en:

- Laboratorio 101, Departamento de Química Analítica, Pgdo. Facultad de Química, UNAM.
- Laboratorio de Cromatografía de Gases, Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Barcelona, España.

## INDICE

	Pag
1 Introducción	1
1.1. Importancia de los HAP's en el medio ambiente	1
1.2. Origen y fuentes de emisión	1
1.3. HAP's en organismos marinos	2
1.4. Análisis de HAP's en matrices biológicas	2
2 Antecedentes	3
2.1. Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS)	3
2.2. Extracción con Líquidos Presurizados (ELP)	4
3 Objetivo	6
TRABAJO EXPERIMENTAL	
4 Extracción y purificación de los HAP's	6
4.1. Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS)	6
4.1.1. Condiciones cromatográficas	6
4.1.2. Elección de adsorbente	8
4.1.3. Muestra libre de HAP's	8
4.1.4. Extracción y limpieza de HAP's	9
4.1.5. Recobro	10
4.1.6. Linealidad	11
4.2. Extracción con Líquidos Presurizados (ELP)	14
4.2.1. Condiciones cromatográficas	14
4.2.2. Elección del disolvente	16
4.2.3. Muestra libre de HAP's	17
4.2.4. Limpieza de extracto de pescado en línea con Florisil	17
4.2.5. Limpieza fuera de línea con Florisil y sílica	18
5 Observaciones	22
6 Bibliografía	23

## **1 INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Importancia de HAP's en el medio ambiente**

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's), han sido ampliamente estudiados en las últimas décadas. Son uno de los grupos más importantes para la contaminación ambiental, por las numerosas fuentes naturales y antropogénicas que contribuyen a su inevitable presencia (Gamal A., 2002). Se han encontrado en todos los medios incluyendo suelo, aire, vegetación, sedimentos, superficie, agua y alimentos (Van A., et al., 2001).

Ha sido demostrado que ciertas mezclas de HAP's son carcinogénicas para mamíferos y algunos han sido implicados como inductores de cáncer de pulmón, piel y seno en humanos (Al-Saleh, I., et al., 2002), además de los efectos carcinogénicos, los HAP's presentan un amplio espectro de efectos tóxicos, incluidos la irritación de ojos y piel, inmunotoxicidad y toxicidad progresiva (Baird, W., et al., 2005).

Han sido incluidos 6 HAP's como sustancias prioritarias en las normas 2000/60/CE, 75/440/CE y 80/778/CEE en la Unión Europea (EU) relativas a la calidad del agua para consumo humano y 16 han sido listados por la Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos (USEPA). Estos hechos demuestran el papel de los HAP's como contaminantes (Martínez E., et al., 2004, Baumard P., et al., 1997).

### **1.2 Origen y fuentes de emisión**

Los HAP's se originan en procesos de combustión incompleta de la materia orgánica y combustibles fósiles (Vives I., et al., 2004). Los productos mayoritarios son moléculas simples ( $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $CO$ ,  $SO_2$ ,  $NO_x$ ,  $HCN$ ) algunas de las cuales, también tienen su papel como contaminantes. En menor cantidad se generan un gran número de sustancias orgánicas de estructura más compleja entre las que se encuentran los hidrocarburos saturados e insaturados, alcoholes, aldehídos, ácidos carboxílicos, ésteres, y todo tipo de compuestos aromáticos incluyendo los HAP's.

Las principales fuentes de emisión de HAP's a la atmósfera son antropogénicas, y consisten en actividades en las que tiene lugar algún tipo de combustión: automóviles, combustión de gas natural, madera, carbón, refinamiento de petróleo, incineración de residuos, humo de tabaco, etc. También existen, en menor medida, fuentes naturales de emisión como la actividad volcánica, los incendios forestales y la biosíntesis (Mitra S., et al., 2003).

### **1.3 HAP's en organismos marinos**

Se han publicado un gran número de informes sobre la presencia de HAP's en organismos marinos, y en particular del benzo(a)pireno. La mayoría de los análisis realizados han empleado como organismos de estudio mejillones y ostras. Estos reciben mayor atención que otros invertebrados o peces, debido a que sus tasas metabólicas son menores, por lo que tienden a bioacumular los contaminantes en sus tejidos y como consecuencia son considerados centinelas de las condiciones de la calidad del agua en los ecosistemas marinos (Baumard, P., et al., 1997 y 1998, Peña A., et al., 2002, Botello A., et al., 2002, Paez-Osuna, F., et al., 2002, Martínez E., et al., 2004).

Los HAP's suelen exhibir un efecto tóxico en organismos marinos invertebrados y peces en concentraciones de solo unos  $\mu\text{g/g}$ . Siendo un componente mayoritario de la cadena alimenticia acuática y un recurso alimenticio para el ser humano, los peces han recibido una atención especial (Vives, I., et al., 2002). Hay un creciente interés para analizar la distribución específica de los HAP's en los organismos marinos (Shallaja, M., et al., 2003), ya que los patrones de bioacumulación de HAP's en el tejido de los peces sigue siendo desconocido (Barron, M., et al., 2004; Deb, S., et al., 2000).

### **1.4 Análisis de HAP's en matrices biológicas**

El análisis de HAP's en muestras de tejido biológico es particularmente difícil, debido a la baja concentración de los compuestos individuales ( $\text{ng/g}$ ), y a la presencia de compuestos de naturaleza lipofílica en los tejidos, que interfieren en el análisis (Peña A., et al., 2002, Simko, P. 2002).

Los dos pasos críticos en el análisis de los HAP's en muestras biológicas son su extracción y purificación. Los métodos de extracción líquido-líquido, digestión alcalina y Soxhlet han sido los más utilizados para la extracción de HAP's en matrices alimentarias y muestras de tejidos biológicos. Algunos de estos métodos han sido adoptados como regulaciones, y cubren ciertas necesidades. Sin embargo, presentan ciertas desventajas en términos de tiempo, costo, impacto ambiental y deficiencias técnicas (Crouch M., et al., 1997).

El objetivo de este trabajo fue proponer la dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) y/o la extracción con líquidos presurizados (ELP), como procedimientos alternativos de extracción en la metodología analítica para la determinación de HAP's, en muestras de pescado. Esto permitiría simplificar el procedimiento y reducir considerablemente los tiempos de análisis, una de las principales desventajas que presentan los métodos convencionales, antes mencionados.

## **2 ANTECEDENTES**

### **2.1 Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS)**

En 1989 se introdujo un nuevo proceso para la extracción de muestras sólidas y semi-sólidas. La DMFS combina varias técnicas que permiten romper la estructura del tejido y extraer los compuestos de interés de la muestra, en forma selectiva.

En la DMFS (figura 1) la muestra es triturada con un adsorbente (ejemplo,  $C_{18}$ ) que actúa como abrasivo, la fuerza de cizalla producida al triturar la muestra junto con el adsorbente provoca la ruptura de los tejidos y permite obtener un material sólido, el cual es utilizado posteriormente para empacar una columna de extracción en fase sólida clásica. El adsorbente funciona como un solvente o un detergente, que disuelve y dispersa los componentes de la muestra sobre la superficie del material recubierto con la fase estacionaria. Así se genera una mayor superficie de contacto que favorece la extracción.

La columna se compone de una jeringa y un par de discos de material poroso entre los cuales va contenido el soporte sólido con la muestra dispersa. El dispositivo se comprime para compactar el adsorbente y obtener el equivalente a una columna de extracción en fase sólida

Finalmente se adiciona a la columna un disolvente o bien una serie de disolventes, para eluir los compuestos de interés. La elución puede llevarse a cabo por gravedad o utilizando vacío (Barker, S., et al, 2000).

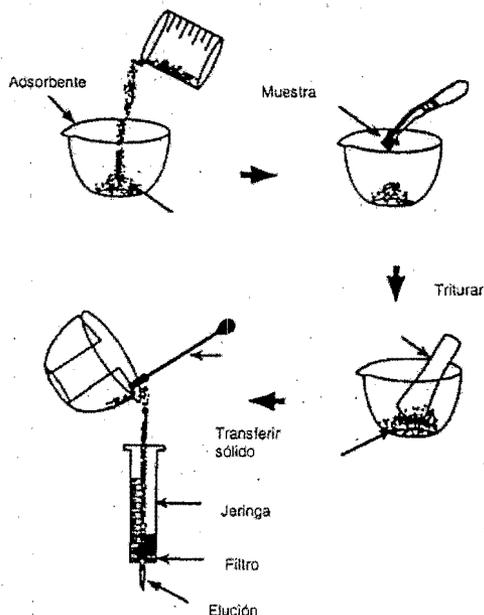


Figura 1. Esquema general de la extracción por dispersión de matriz en fase sólida

## 2.2 Extracción con líquidos presurizados (ELP)

La ELP es una técnica de preparación de muestras, que se diferencia de los métodos convencionales realizados en condiciones ambientales, porque combina elevadas presiones y temperaturas con disolventes líquidos, para permitir la extracción de los analitos de forma rápida y efectiva. La ELP ha demostrado ser equivalente a las metodologías de extracción existentes, hasta el punto de ser rápidamente aceptado por la USEPA como método de evaluación de residuos sólidos (Método 3545 de la USEPA; 1995). En diversos estudios, se ha visto que al modificar los parámetros puede ser un sistema de extracción muy efectivo; especialmente para muestras muy contaminadas o matrices complejas (Wang, G., et al., 1999).

El sistema (figura 2) consiste en una celda de extracción de acero, en la que los parámetros programados (temperatura y presión) se mantienen en valores específicos, gracias a controles de temperatura y a bombas que controlan el disolvente orgánico, el cual se

mantiene en estado líquido al presurizar la celda a pesar de las temperaturas relativamente altas usadas para la extracción.

Básicamente la celda se introduce en un circuito cerrado a través del cual se hace pasar disolvente mediante vacío. El disolvente pasa a la celda y permanece a la temperatura y presión indicadas, durante el tiempo y el número de veces deseado. Acabado ese tiempo el disolvente de la celda pasa a una botella donde se colecta el extracto junto con el disolvente usado para limpiar la celda.

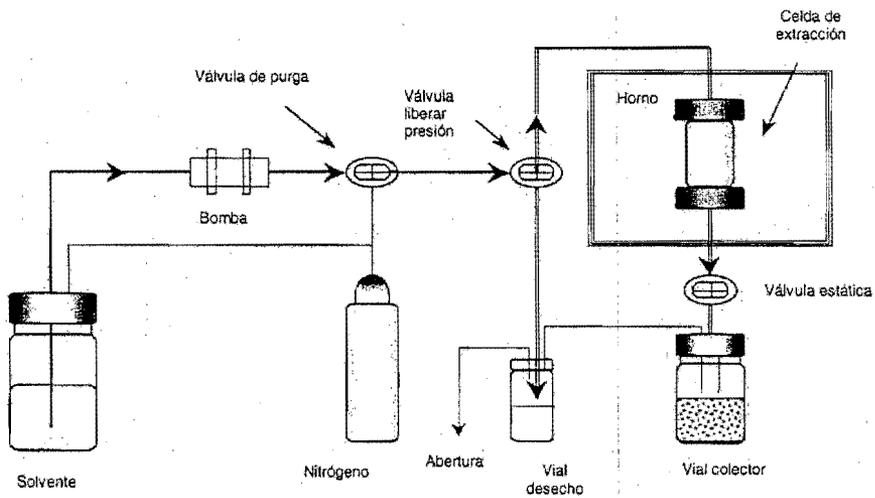


Figura 2. Esquema general de la extracción con líquidos presurizados ELP

### 3 OBJETIVO

El objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo y comparación de dos métodos analíticos para la determinación de los HAP's en muestras de pescado, por cromatografía de gases utilizando como técnicas de extracción la DMFS y la ELP.

### TRABAJO EXPERIMENTAL

El trabajo experimental se presenta en dos partes. La primera corresponde a la DMFS, que se efectuó en el laboratorio 101, Depto. de Química Analítica, Pgdo. Fac. de Química UNAM. La segunda, corresponde a la ELP que se efectuó en el laboratorio de cromatografía de gases, Depto. de Química Analítica de la Universidad de Barcelona, España.

### 4 Extracción y purificación de los HAP's

#### 4.1. Dispersión de matriz en fase sólida (DMFS)

Como primer paso para el desarrollo y la optimización del método de extracción por DMFS, se determinaron las condiciones óptimas para la separación cromatográfica de los 16 HAP's en estudio.

##### 4.1.1. Condiciones cromatográficas

Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 SERIES II Plus con sistema de inyección cold on-column, sistema electrónico de presión y detector de ionización de flama. Se empleó una columna capilar de sílice fundida Zebron ZB-5 Phenomenex con 5% fenil 95% metilpolisiloxano como fase estacionaria; 30 m longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor de la fase estacionaria.

Después de varias pruebas se obtuvo la mejor separación de los 16 compuestos. La figura 3 muestra un cromatograma obtenido utilizando los parámetros cromatográficos enlistados en la tabla 1 y se puede observar que la separación cromatográfica de los compuestos, es adecuada y el tiempo de análisis es menor a 20 min. La tabla 2 recoge los tiempos de retención ( $t_r$ ) de los 16 HAP's identificados en la figura 3.

Tabla 1. Parámetros cromatográficos.

Parámetros	Columna ZB5
Modo de inyección	On-column
Volumen de inyección	1 µL
Temperatura de inyector	Programado a 3°C arriba de la T. del horno
Flujo	2 mL/min
Temperatura detector	320°C
Gas portador	Hidrogeno
Gas auxiliar	Nitrógeno
Programa de temperatura	
Temperatura 1	60°C/ 1min
Incremento de temperatura	20°C/ min
Temperatura 2	250°C/ 0 min
Incremento de temperatura	5°C/min
Temperatura 3	320 °C/ 10min

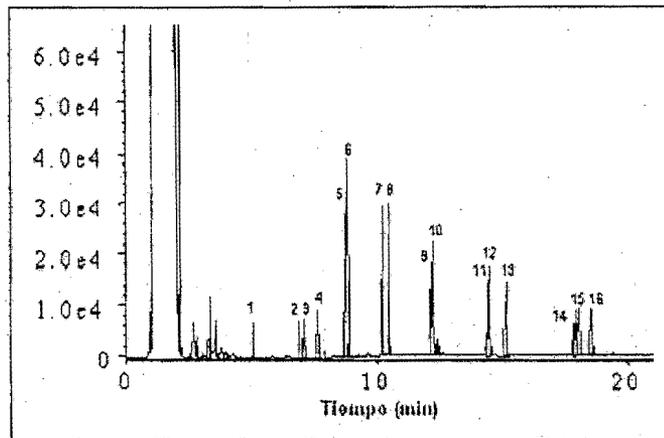


Figura 3. Cromatograma de la separación de una disolución estándar de los 16 HAP's estudiados: (1)Naftaleno, (2) Acenaftileno, (3) Acenafteno, (4) Fluoreno, (5) Fenantreno, (6) Antraceno, (7) Fluoranteno, (8) Pireno, (9) Benzo(a)antraceno, (10) Criseno, (11) Benzo(b)fluoranteno, (12) Benzo(k)fluoranteno, (13) Benzo(a)pireno, (14) Indeno(1,2,3-cd)pireno, (15)Dibenzo(ah)antraceno, (16)Benzo(ghi)perileno.

Tabla 2. Tiempos de retención de los 16 HAP's analizados en las condiciones cromatográficas óptimas de separación.

Compuesto	tr
Naftaleno	5.095
Acenaftileno	6.921
Acenafteno	7.142
Fluoreno	7.739
Fenantreno	8.858
Antraceno	8.913
Fluoranteno	10.278
Pireno	10.533
Benzo(a)antraceno	12.283
Criseno	12.35
Benzo(b)fluoranteno	14.489
Benzo(k)fluoranteno	14.545
Benzo(a)pireno	15.201
Indeno(123-cd)antraceno	17.98
Dibenzo(ah)antraceno	18.09
Benzo(ghi)perileno	18.587

#### 4.1.2. Elección de adsorbente

Se determinó la capacidad de dos adsorbentes para extraer selectivamente los compuestos de interés mediante DMFS.

- Alumina, (MERCK Gernsheim, Alemania) activada al 5% con agua
- CHROMABOND C<sub>18</sub> PAH, (MACHEREY-NAGEL Düren, Alemania)

Se pesaron aproximadamente 0.5 g de adsorbente, se depositaron en un mortero de agata y se fortificaron con una mezcla de 16 HAP's, se dejó reposar 5 min y se molió durante 3 min. El adsorbente fortificado y molido se empacó en una jeringa entre dos filtros. El cartucho se eluyó con 4 mL de hexano y el eluato se redujo a aproximadamente 1 mL, con una corriente de N<sub>2</sub>. A continuación se realizó el análisis cromatográfico, en las condiciones que se indican en la tabla 1.

La extracción con CHROMABOND C<sub>18</sub> PAH presenta menos impurezas (figura 4A) en comparación con la de Alumina (figura 4B). Por lo que este adsorbente se seleccionó como el más adecuado para realizar la extracción.

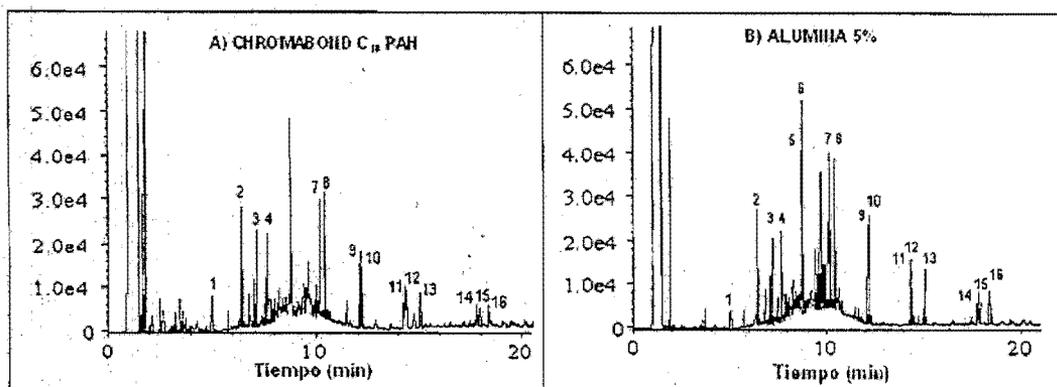


Figura 4. Cromatogramas de la DMFS utilizando A) CROMABOND C<sub>18</sub> PAH y B) Alumina activada al 5% con agua.

#### 4.1.3. Muestra libre de HAP's

Se compró un ejemplar de mojarra en un supermercado local, se extrajo el músculo y se homogeneizó en un procesador de alimentos. La pasta resultante se dividió en pequeñas porciones y se congeló, previamente se determinó el contenido de humedad (80 %) y el de grasa (1%). Esta muestra se utilizó para realizar las pruebas de limpieza, porcentaje de recobro y linealidad.

#### 4.1.4. Extracción y limpieza de HAP's

La DMFS no fue selectiva para la extracción de HAP's ya que extrajo una cantidad considerable de grasa de la muestra, así que fue necesario limpiar el extracto antes de realizar su análisis cromatográfico. Es por esta razón que se determinó la capacidad de dos adsorbentes como retenedores de grasa, en combinación con varios disolventes para eluir selectivamente los HAP's.

Los adsorbentes probados para retener la grasa fueron:

- Silica (MERCK. Gernsheim, Alemania) tamaño de partícula 0.2-0.5 mm. Se preparó silica ácida al 40% con  $H_2SO_4$ .
- Florisil (Varian aerograph. California, EUA) tamaño de partícula 0.14-0.25 mm

El procedimiento que se utilizó para la extracción y limpieza de los HAP's consistió en colocar en un mortero de ágata 0.5 g de CHROMABOND  $C_{18}$  PAH y 0.125 g de homogeneizado de pescado, adicionados con una disolución estándar de los 16 HAP todo se molió en el mortero y el material resultante se empacó entre dos filtros en una jeringa de vidrio, en la que previamente se empacaron 0.75 g del adsorbente utilizado como retenedor de grasa. La elución de los compuestos se realizó con 4 mL de disolvente.

Los disolventes que se probaron para eluir los analitos fueron:

- Hexano grado HPLC (EM-SCIENCE. New Jersey, EUA)
- Diclorometano 99.8% pureza (Mallinckrodt. New Jersey, EUA)
- Tolueno 99% pureza (J.T. Baker. México)
- Acetonitrilo grado HPLC (PROLABO. París, Francia)
- Difenil éter disuelto en hexano
- Mezclas de hexano/diclorometano (1:1), (3:2) y (2:1)

Se realizaron varios ensayos con los retenedores de grasa y los disolventes. Se determinó, que ambos adsorbentes fueron capaces de retener la grasa. Sin embargo, al realizar las pruebas adicionando los 16 HAP's a los dos adsorbentes y realizar la extracción por DMFS, se encontró que aunque la silica ácida fue capaz de eliminar la grasa no fue posible eluir los 16 compuestos en estudio, ya que el acenaftileno (2) y el benzo(a)pireno (13) siempre se quedaron retenidos en la columna (figura 5). De igual manera después de varios ensayos,

se determinó que el disolvente más adecuado para eluir los HAP's con mínima extracción de grasa era la mezcla hexano/diclorometano (2:1).

El Florisil se eligió como el adsorbente más adecuado para utilizarse como retenedor de grasa, ya que demostró ser el más eficiente para eluir los 16 HAP's, sin extraer grasa con 4 mL de la mezcla hexano/diclorometano 2:1.

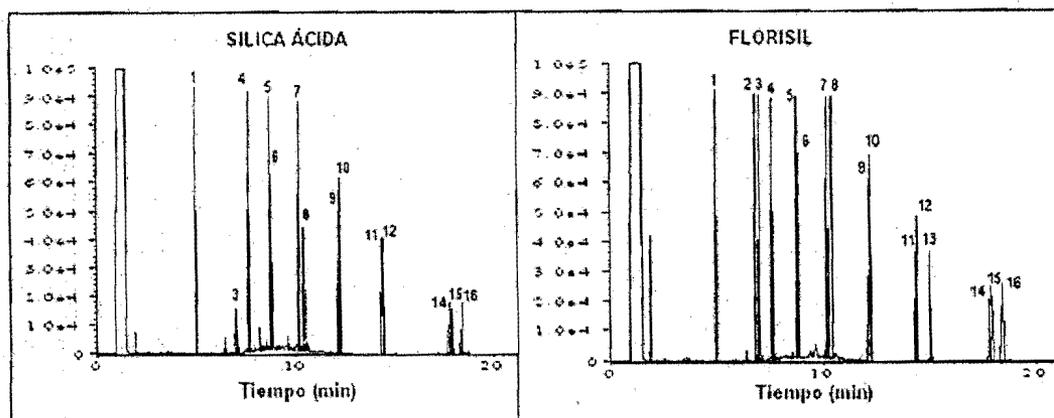


Figura 5. Cromatogramas de la DMFS de una disolución estándar de 16 HAP's, utilizando silica ácida y Florisil como retenedores de grasa.

#### 4.1.5. Recobro

Después de optimizar las condiciones de extracción y limpieza de los HAP's por DMFS sección 4.1.4, se procedió a fortificar muestras (libres de HAP's) con disoluciones estándar de HAP's a diferentes concentraciones 0.1, 0.25 y 0.5 ppm, para determinar el porcentaje de recobro.

Para cada concentración se hicieron dos determinaciones y los blancos correspondientes. El procedimiento utilizado, consistió en colocar en un mortero de agata 0.5 g de CHOMABOND C<sub>18</sub> PAH y 0.125 g de homogeneizado de pescado, adicionados con una disolución estándar de los 16 HAP, todo se molió en el mortero de agata y el material resultante se empacó entre dos filtros en una jeringa de vidrio, en la que previamente se empacaron 0.75 g Florisil como retenedor de grasa. La elución de los compuestos se realizó con 4 mL de la mezcla hexano/diclorometano 2:1.

El eluato se redujo a un volumen final de 1 mL con una corriente de N<sub>2</sub> y se inyectó en el cromatógrafo de gases, en las condiciones indicadas en la tabla 1.

Como se observa en la tabla 3, se obtienen resultados aceptables en concentraciones relativamente elevadas (0.25 ppm), ya que a menor concentración (0.1ppm) se obtienen porcentos de recobro muy altos, hecho que atribuimos a la interferencia de las impurezas de la matriz, que son extraídas con los compuestos de interés (figura 6).

Tabla 3. Porciento de recobro a 0.5, 0.25 y 0.1 ppm

Compuestos	% Recobro 0.1ppm	% Recobro 0.25ppm	% Recobro 0.5ppm
Naftaleno	95.75	98.48	97.87
Acenaftileno	119.77	87.39	107.18
Acenafteno	112.25	89.22	99.75
Fluoreno	105.40	86.76	100.83
Fenantreno	83.60	78.97	106.12
Antraceno	113.25	96.12	106.06
Fluoranteno	231.10	93.35	108.70
Pireno	132.46	90.29	101.28
Benzo(a)antraceno	155.58	91.44	97.99
Criseno	146.69	84.52	101.45
Benzo(b)fluoranteno	127.23	102.23	106.54
Benzo(k)fluoranteno	119.81	86.01	104.81
Benzo(a)pireno	125.81	109.66	139.13
Indeno(123-cd)antraceno	146.33	80.12	102.13
Dibenzo(ah)antraceno	126.60	89.16	109.62
Benzo(ghi)perileno	188.93	95.84	117.46

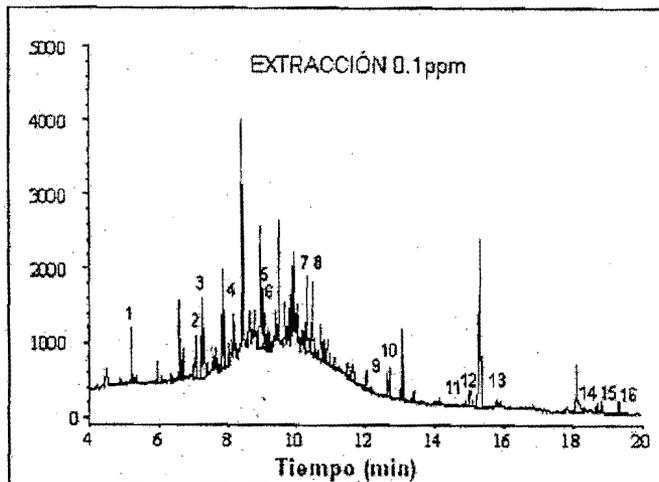


Figura 6. Cromatograma de la extracción por DMFS de músculo de pescado (0.125 g) adicionado con una disolución estándar de 16 HAP's, utilizando Florisil (0.75 g) como retenedor de grasa. Concentración final de HAP's 0.1 ppm.

#### 4.1.6. Linealidad

Utilizando las condiciones óptimas para la DMFS, se realizó una curva de calibrado. Se prepararon cinco puntos 0.1, 0.125, 0.25, 0.5 y 1.0 ppm, mediante la adición de muestras de pescado (libres de HAP's), con disoluciones estándar de los 16 HAP's. La curva se hizo por triplicado y en cada caso, se hicieron los blancos correspondientes.

Se siguió el mismo procedimiento experimental que en la sección 4.1.5., y los extractos se inyectaron en el cromatógrafo de gases, en las condiciones indicadas en la tabla 1.

La tabla 4 muestra los datos obtenidos para la concentración de 0.25 ppm, los coeficientes de variación en la mayoría de los casos fueron menores al 10%, esto nos indica que hay buena repetitividad y por ende precisión en la determinación de las curvas de calibrado. Más aún, si consideramos que los resultados se obtuvieron realizando tres experimentos independientes para cada concentración. A manera de ejemplo la figura 7 muestra la curva de calibrado del Benzo(a)antraceno.

Tabla 4. Datos del área promedio, desviación estándar y coeficientes de variación de los 16 HAP's a 0.25 ppm de concentración.

Compuesto	Área promedio	Desv. Est.	%CV n=3
Naftaleno	2263.33	32.58	1.44
Acenaftileno	1928.33	115.09	5.97
Acenafteno	2114.33	101.28	4.79
Fluoreno	2781.33	117.30	4.22
Fenantreno	3081.33	106.05	3.44
Antraceno	1918.00	138.86	6.93
Fluoranteno	2270.67	23.12	1.02
Pireno	1943.67	1.15	0.06
Benzo(a)antraceno	1771.33	25.81	1.46
Criseño	1948.00	35.11	2.83
Benzo(b)fluoranteno	1714.67	316.46	18.46
Benzo(k)fluoranteno	1647.67	248.95	15.11
Benzo(a)pireno	684.33	63.41	9.27
Indeno(123-cd)antraceno	749.00	46.03	6.15
Dibenzo(ah)antraceno	991.67	86.80	8.75
Benzo(ghi)perileno	884.67	39.88	4.51

La tabla 5 enlista el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) y la pendiente (m) obtenidos a partir de las rectas de calibrado de cada compuesto. Los resultados nos hablan de una tendencia claramente lineal para 12 de los 16 HAP's, ya que los coeficientes de correlación de estos compuestos están entre 0.9878 y 0.9951, excepto para naftaleno, fenantreno, fluoreno, benzo(b)fluoranteno e indeno(123-cd)antraceno que tienen coeficientes de correlación menores a 0.98.

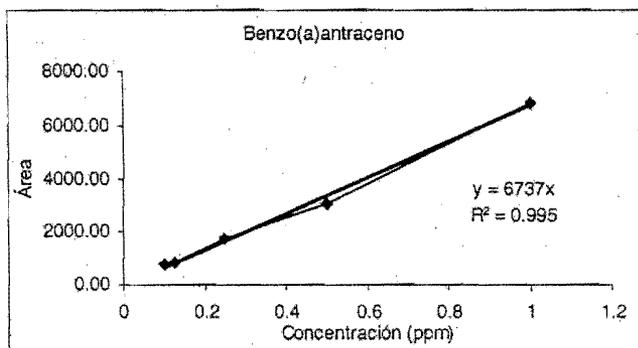


Figura 7. Curva de calibración del Benzo(a)antraceno

Tabla 5. Coeficientes de correlación y pendiente de las curvas de calibrado de los 16 HAP's en el intervalo de concentración 0.1-1 ppm.

Compuesto	Curva de calibrado	
	Pendiente	Coef. de correlación
Naftaleno	7138.6	0.9600
Acenaftileno	6633.1	0.9921
Acenafteno	7118.8	0.9899
Fluoreno	8206.3	0.9197
Fenantreno	8792.8	0.8891
Antraceno	6631.0	0.9878
Fluoranteno	8117.4	0.9892
Pireno	7615.9	0.9932
Benzo(a)antraceno	6737.0	0.9950
Criseno	7205.7	0.9951
Benzo(b)fluoranteno	5980.0	0.9774
Benzo(k)fluoranteno	6173.1	0.9904
Benzo(a)pireno	6242.8	0.9902
Indeno(123-cd)antraceno	3839.1	0.9713
Dibenzo(ah)antraceno	3463.7	0.9899
Benzo(ghi)perileno	3996.6	0.9945

## 4.2. Extracción con líquidos presurizados

El primer paso para el desarrollo y la optimización de un método de extracción por ELP es el establecimiento de las condiciones de extracción iniciales, las cuales se han de escoger en función de los analitos y las características de la matriz.

Las condiciones iniciales de extracción propuestas se enlistan en la tabla 6, se seleccionaron aquellas que proporcionan buenos resultados para la extracción de HAP's en matrices de características similares (Martínez E., et al, 2004).

Tabla 6. Condiciones iniciales propuestas para la extracción con líquidos presurizados de HAP's en muestras de pescado.

Parámetro	Condiciones
Celda	34 mL
Presión	1500 psi
Temperatura	100°C
Tiempo	10 min
Purga	90 s
Vol. vaciado	80%
Ciclos	2

Se utilizó un equipo ASE 100 (Accelerated solvent extractor), Dionex Corporation California, EUA. Extractor con una celda de acero inoxidable, adaptable a 34 y 100 mL, controladores de presión 1500 psi (constante) y temperatura variable.

### 4.2.1. Condiciones cromatográficas

Se utilizó un cromatógrafo TRACE GC 2000 SERIES, con inyector split/splitless, detector de ionización de flama e inyector automático AS 2000 de ThermoQuest. Se empleó una columna capilar DB-5MS JW Scientific con 5% fenil 95% metilpolisiloxano como fase estacionaria; 30 m longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de la fase estacionaria.

Después de varias pruebas se obtuvo la mejor separación de los 16 compuestos. La figura 8 muestra un cromatograma obtenido utilizando los parámetros cromatográficos enlistados en la Tabla 7, y se puede observar que la separación cromatográfica de los compuestos es adecuada y el tiempo de análisis es menor a 20 min. La tabla 8 recoge los tiempos de retención (tr) de los HAP's identificados en la figura 8.

Tabla 7. Parámetros cromatográficos y programa de temperatura.

Parámetros	Columna DB5
Modo de inyección	Splitless
Tiempo splitless	60 seg
Volumen de inyección	1 µL
Temperatura de inyector	270°C
Flujo	1.5 mL/min
Temperatura detector	300°C
Gas portador	Helio
Gas auxiliar	Nitrógeno
Programa de temperatura	
Temperatura 1	90°C/ 1min
Incremento de temperatura	20°C/ min
Temperatura 2	250°C/ 0 min
Incremento de temperatura	5°C/min
Temperatura 3	300 °C/ 20min

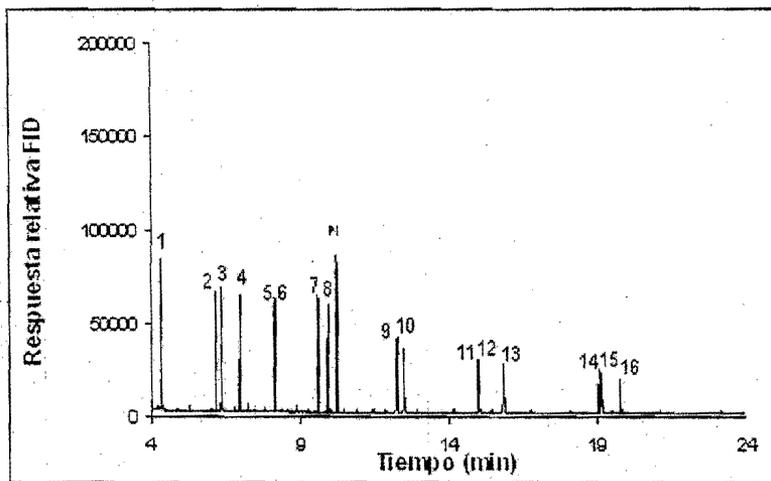


Figura 8. Cromatograma de una disolución patrón de los 16 HAP's estudiados: (1)Naftaleno, (2) Acenaftileno, (3) Acenafteno, (4) Fluoreno, (5) Fenantreno, (6) Antraceno, (7) Fluoranteno, (8) Pireno, (P) p-Terfenil; (9) Benzo(a)antraceno, (10) Criseno, (11) Benzo(b)fluoranteno, (12) Benzo(k)fluoranteno, (13) Benzo(a)pireno, (14) Indeno(1,2,3-cd)pireno, (15)Dibenzo(ah)antraceno, (16)Benzo(ghi)perileno.

Tabla 8. Tiempos de retención de los 16 HAP's analizados en las condiciones óptimas de separación.

Compuesto	tr
Naftaleno	4.323
Acenaftileno	6.142
Acenafteno	6.35
Fluoreno	6.97
Fenantreno	8.128
Antraceno	8.192
Fluoranteno	9.623
Pireno	9.952
p-Terfenil	10.263
Benzo(a)antraceno	12.215
Criseno	12.297
Benzo(b)fluoranteno	14.96
Benzo(k)fluoranteno	15.037
Benzo(a)pireno	15.845
Indeno(123-cd)antraceno	19.03
Dibenzo(ah)antraceno	19.155
Benzo(ghi)perileno	19.785

#### 4.2.2. Elección del disolvente

Se determinó la capacidad de dos mezclas de disolventes para extraer selectivamente los 16 HAP's

- Hexano/Diclorometano (1:1), Diclorometano 99.8 % pureza (Sigma Aldrich. Missouri, EUA)
- Hexano/Acetona (1:1), Hexano > 95% pureza (Sigma Aldrich. Missouri, EUA) y Acetona grado HPLC (MERCK. Gernsheim, Alemania)

La celda de extracción de 34 mL, se llenó con tierra de diatomeas (Varian. California, EUA), el adsorbente se adicionó con una disolución estándar de la mezcla de 16 HAP's. La celda cerrada herméticamente, se colocó en el aparato ASE 100. La extracción se realizó con las dos mezclas de disolvente, en las condiciones indicadas en la tabla 6.

El extracto obtenido (130 mL) se redujo con el equipo Turbo Vap II, Concentration Workstation (Caliper Life Science. California, EUA) a aproximadamente 1 mL, se transfirió a un vial previamente pesado y se evaporó hasta 150  $\mu$ L con una corriente de  $N_2$ , se adiciono al extracto p-Terfenil como estándar interno y se inyectó en las condiciones indicadas en la tabla 7.

Como se puede observar en la figura 9, solo hay pequeñas diferencias al extraer una disolución estándar con hexano/diclorometano o con hexano/acetona sin embargo, se decidió realizar las pruebas de limpieza utilizando como disolvente hexano/diclorometano, que consideramos extrae menos impurezas, sin descartar que en lo subsiguiente pudiera ser de utilidad la mezcla hexano/acetona.

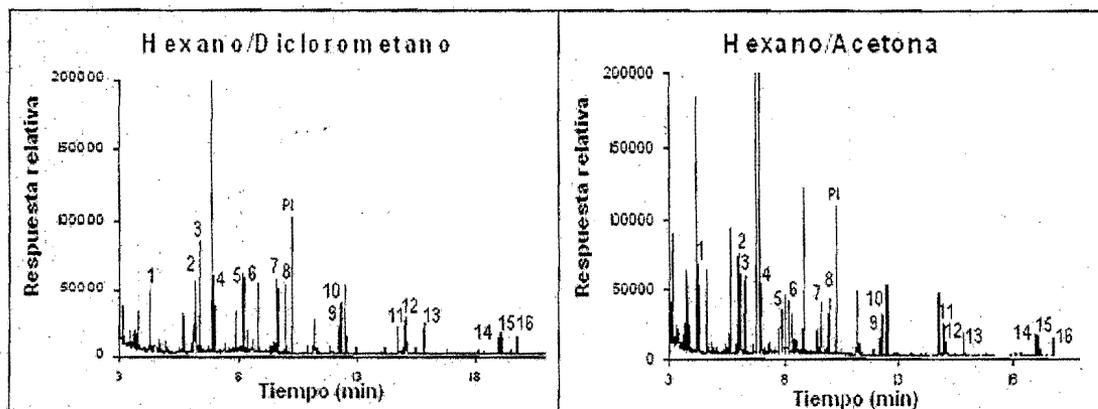


Figura 9. Cromatogramas de la ELP de una disolución patrón de los 16 HAP's, patrón interno (p-Terfenil). Empleando como disolvente hexano/diclorometano y hexano/acetona

#### 4.2.3. Muestra libre de HAP's

Se compraron 8 ejemplares de trucha en un supermercado local, se pesaron, midieron y limpiaron. El músculo sin piel y sin vísceras se homogeneizó en un procesador de alimentos, la pasta resultante se congeló y liofilizó durante 24 horas, por diferencia de peso de la pasta homogeneizada, antes y después de liofilizar, se determinó que la muestra tenía un 76 % de humedad.

El material liofilizado se molió hasta obtener un polvo fino que se guardó hasta su análisis en viales de vidrio previamente etiquetados. Esta muestra se utilizó para realizar las pruebas de limpieza.

#### 4.2.4. Limpieza de extracto de pescado en línea con Florisil

Se intentó realizar la extracción de los HAP's y la limpieza de los extractos de pescado en línea, para ello se hicieron pruebas utilizando Florisil.

0.5 g de liofilizado de trucha, se adicionaron con una disolución estándar de la mezcla de 16 HAP's, la muestra adicionada se molió con 1.5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro (MERCK Gernsheim, Alemania).

En una celda de extracción de 34 mL, se pusieron en capas consecutivas tierra de diatomeas, 10 g de Florisil (MERCK. Gernsheim, Alemania) tamaño de partícula 0.15-0.25 mm previamente activados a 400°C y sobre el Florisil se depositó la muestra previamente adicionada y molida. La celda se cerró herméticamente y se realizó la extracción utilizando hexano/diclorometano como disolvente y siguiendo las condiciones indicadas en la tabla 6.

El extracto resultante, aproximadamente 130 mL al igual que para la sección 4.2.2., se redujo a aproximadamente 1 mL. Se transfirió a un vial previamente pesado y se evaporó hasta aproximadamente 150  $\mu\text{L}$  con una corriente de  $\text{N}_2$ . Por último se adicionó el estándar interno y se inyectó en las condiciones indicadas en la tabla 7.

La figura 10 muestra como el Florisil no fue capaz de retener las impurezas que eluyen junto con los compuestos de interés, bajo las condiciones de extracción con líquidos presurizados.

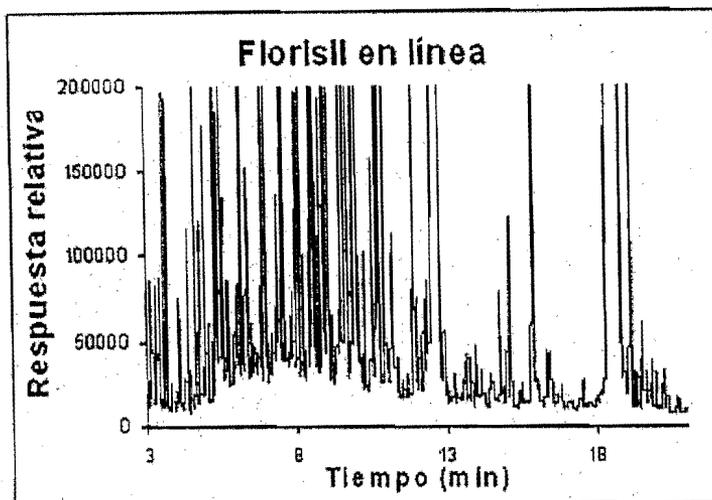


Figura 10. Cromatograma de la limpieza en línea con Florisil, de 0.5 g de liofilizado, adicionado con una disolución de la mezcla estándar de 16 HAP's

#### 4.2.5. Limpieza fuera de línea con Florisil y silica.

Se probaron silica y Florisil como adsorbentes para empacar columnas y limpiar los extractos de pescado.

El procedimiento utilizado, consistió en moler 0.5 g de liofilizado de trucha con 1.5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Esta mezcla se introdujo en la parte superior de una celda de extracción de 34 mL llena con tierra de diatomeas. Se cerró herméticamente y se realizó la extracción utilizando hexano/diclorometano como disolvente y siguiendo las condiciones indicadas en la tabla 6.

El extracto resultante (130 mL), se redujo a 5 mL y se adicionó con una disolución estándar de la mezcla de 16 HAP's.

Una columna de vidrio de 50 cm de largo con llave de teflón se empacó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  en los extremos y con 20 g de silica (MERCK. Gernsheim, Alemania) o Florisil, según el caso. La columna se pre-eluyó con 70 mL hexano/diclorometano (9:1). Antes de que quedara expuesto el  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se transfirió el extracto de pescado adicionado. La elución de los compuestos se realizó con 100 mL hexano/diclorometano 9:1 seguidos de 100 mL hexano/diclorometano 1:1.

El eluato de hexano/diclorometano 1:1 obtenido a partir de la limpieza fuera de línea con silica, se colectó en fracciones de aproximadamente 20 mL, cada fracción se redujo a 1 mL. Se transfirió a un vial previamente pesado, se evaporó hasta aproximadamente 150  $\mu\text{L}$  con una corriente de  $\text{N}_2$ , y se inyectó en las condiciones indicadas en la tabla 7.

La mayoría de los HAP's se eluyen con hexano/diclorometano 1:1 como se puede ver en el perfil de elución (figura 11). El naftaleno es el único que eluye con hexano /diclorometano 9:1.

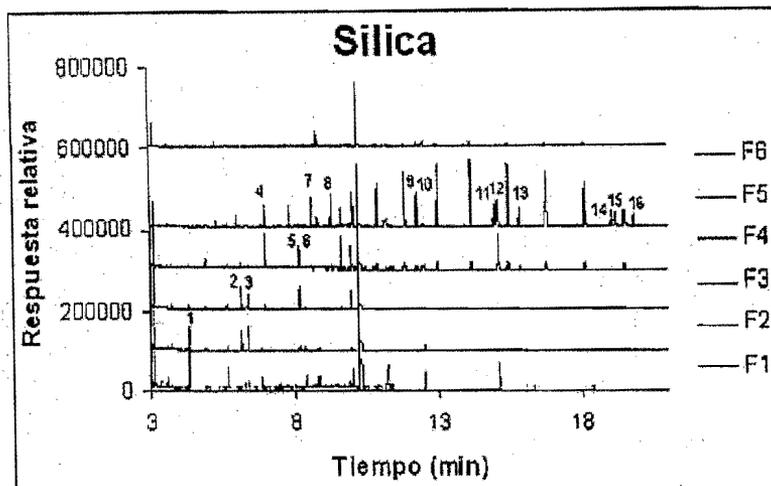


Figura 11. Cromatograma del perfil de elución de HAP's, obtenido después de limpiar con sílica un extracto de pescado, adicionado con una disolución patrón de los 16 HAP's. La F1 corresponde a la elución con hexano/diclorometano 9:1. Las F2-6 corresponden a la elución con hexano/diclorometano 1:1.

Como resultado de la limpieza fuera de línea con Florisil se encontró que, el adsorbente fue capaz de eliminar las impurezas que co-eluyen con los HAP's. Sin embargo, solo fue posible eluir a 15 de los HAP's (figura 12), el benzo(a)pireno permaneció retenido en el adsorbente.

Se probó eluir con un mayor volumen de disolvente, sin éxito. Se intentó aumentar la proporción del diclorometano en la mezcla hexano/diclorometano y tampoco se logró una mejoría significativa.

Finalmente se probó adicionar agua al adsorbente para disminuir la fuerza con la que se adsorben los compuestos y fue así como se logró eluir los 16 HAP's. Se hicieron pruebas adicionando volúmenes de agua entre 0 y 5% (figura 12). Se determinó que 5% de agua era el porcentaje óptimo para eluir los compuestos, porque solo así fue posible eluir al benzo(a)pireno que de otra forma quedaba retenido en el adsorbente.

Sin embargo, se puede observar en la figura 12 que al adicionar un volumen mayor de agua al Florisil, también co-eluyen una mayor cantidad de impurezas.

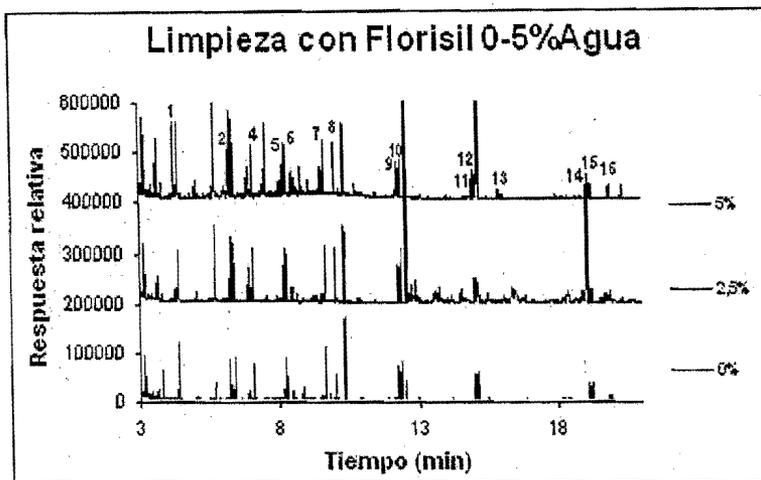


Figura 12. Limpieza de extractos de pescado, adicionados con una disolución estándar de los 16 HAP's, con Florisil a diferentes % agua.

Se compararon los resultados obtenidos a partir de las limpiezas fuera de línea, hechas con Florisil y sílica. En la figura 13 se puede observar que la señal de los HAP's, principalmente los cuatro últimos, utilizando Florisil es visiblemente menor respecto a la que se obtiene al realizar la limpieza con sílica.

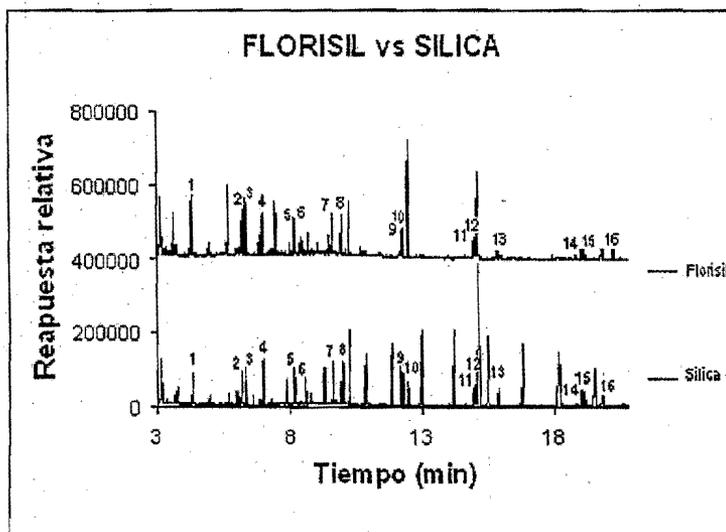


Figura 13. Cromatogramas de la limpieza de extractos de pescado, adicionados con una disolución patrón de los 16 HAP's, empleando sílica y Florisil.

Esto se confirmó al calcular el recobro de los últimos cuatro compuestos:

Compuesto	%Recobro Silica	%Recobro Florisil
Benzo(a)pireno	68	27
Indeno(1,2,3-cd)antraceno	64	50
Dibenzo(ah)antraceno	63	49
Benzo(ghi)perileno	40	30

Hago énfasis en estos cuatro HAP's, porque a pesar de mantener el adsorbente en la estufa o en un desecador. La capacidad del Florisil, para retener estos últimos cuatro compuestos variaba constantemente. De ahí que el inconveniente mas importante que presentó la limpieza con Florisil fue la dificultad para repetir los resultados.

Con base en todo lo anterior. Se selecciono la silica como el adsorbente más adecuado para la limpieza de los extractos de pescado.

## 5 OBSERVACIONES

La DMFS presenta varias ventajas, se requiere de una pequeña cantidad de muestra aproximadamente 125 mg de tejido fresco, se emplean cantidades mínimas de adsorbente 0.5 g de C<sub>18</sub> para la dispersión y 0.75 g de Florisil para la limpieza. Además se utiliza muy poco disolvente (4 mL) y por lo consiguiente se generan menos residuos en comparación con la ELP (200 mL).

Las pruebas de extracción por DMFS se realizaron con muestras adicionadas. La concentración más baja analizada por cromatografía de gases fue de 100 ng/mL que es una concentración alta, si tenemos en cuenta que los HAP's suelen encontrarse en muestras contaminantes en concentraciones del orden de 0.5-10 ng/mL (EPIC 2004).

El intervalo lineal obtenido (0.1-1 µg/mL) para el método propuesto por DMFS-CGC se utilizó para analizar una muestra contaminada de Mojarra Castarrica (capturada en septiembre de 2004, en la laguna El Yucateco, Veracruz) proporcionada por el Laboratorio de Contaminación Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. Sin embargo, con este intervalo de concentraciones no fue posible identificar con certeza ninguno de los HAP's.

La ELP permite manejar mayores cantidades de muestra (0.5 g liofilizado) con respecto a la DMFS de pescado (0.125 mg tejido), lo que es importante cuando se analizan compuestos a niveles traza, como es el caso de los HAP's. Sin embargo, debido a que las condiciones de la técnica de extracción son más drásticas: presión 1500 psi y temperatura 100 °C, los extractos obtenidos requieren de un proceso de limpieza más efectivo que involucra grandes cantidades tanto de adsorbente (20 g de sílica) como de disolventes (200 mL) lo que representa una desventaja con respecto a la DMFS que utiliza pequeñas cantidades (4 mL).

Las pruebas preliminares de extracción por ELP se realizaron con estándares y en algunos casos con muestras adicionadas. Las concentraciones analizadas por cromatografía

de gases fueron del orden de 10 µg/mL, muy por encima de la concentración a la que se pueden encontrar los HAP's en muestras contaminadas (EPIC 2004).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Al-Saleh, Iman., Al-Doush, Inaam., **Gas chromatography-mass spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in five species of fish from three sites in the Arabian Gulf.** International Journal of Environmental Health Research (2002), 12, 193-200
2. Baird, William M.; Hooven, Louisa A.; Mahadevan, Brinda. **Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action.** Environmental and Molecular Mutagenesis (2005), 45(2/3), 106-114.
3. Barker Steven A., **Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis,** Journal of Chromatography A. 880 (2000) 63-68
4. Barron, Mace G.; Carls, Mark G.; Heintz, Ron; Rice, Stanley D. **Evaluation of fish early life-stage toxicity models of chronic embryonic exposures to complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures.** Toxicological Sciences (2004), 78(1), 60-67.
5. Baumard, P.; Budzinski, H.; Garrigues, P. **Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry: application to mussels.** Fresenius' Journal of Analytical Chemistry (1997), 359(6), 502-509.
6. Baumard, P.; Budzinski, H.; Garrigues, P., Sorbe, J.C., Burgeot, T., Bellocq J. **Concentrations of PAHs (Polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level.** Marine Pollution Bulletin (1998), 36(12), 951-960.
7. Botello, A. V.; Garcia-Ruelas, C.; Ponce-Velez, G. **PAH levels in bivalve mollusks from the mexican subtropical pacific.** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology (2002), 69(4), 486-493.
8. Crouch Michael D., Barker Steven A., **Analysis of toxic wastes in tissues from aquatic species applications of matrix solid-phase dispersion,** Journal of Chromatography A, 774 (1997) 287-309
9. Deb, Swapan C.; Araki, Taro; Fukushima, Takehiko. **Polycyclic aromatic hydrocarbons in fish organs.** Marine Pollution Bulletin (2000), 40(10), 882-885.
10. EPIC (European prospective investigation on cancer), **Food Content of Potential Carcinogens,** Barcelona 2004.
11. Gamal A. Mostafa., **Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in seafoods from Lake Timsah.** International Journal of Environmental Health Research (2002), 12, 83-91.
12. Martinez, Elena; Gros, Meritxell; Lacorte, Silvia; Barcelo, Damian. **Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and mussels.** Journal of Chromatography, A (2004), 1047(2), 181-188.
13. Mitra, S.; Bianchi, T.S. **A preliminary assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon distributions in the lower Mississippi River and Gulf of Mexico.** Marine Chemistry (2003), 82, 273-288.

14. Paez-Osuna, F.; Ruiz-Fernandez, A. C.; Botello, A. V.; Ponce-Velez, G.; Osuna-Lopez, J. I.; Frias-Espicueta, M. G.; Lopez-Lopez, G.; Zazueta-Padilla, H. M. **Concentrations of selected trace metals (Cu, Pb, Zn), organochlorines (PCBs, HCB) and total PAHs in mangrove oysters from the Pacific Coast of Mexico: an overview.** Marine Pollution Bulletin (2002), 44(11), 1303-1308.
15. Peña, A., Morales J., Labastida C., y Capella S., **Extracción en fase sólida como una alternativa para el procedimiento de limpieza en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por cromatografía de gases: aplicación a organismos marinos.**, Rev. Int. Comtam. Ambient., Vol.18 (2) Pag. 13-23, 2002.
16. Shailaja, M.S., D'Silva, Classy., **Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers.** Chemosphere (2003), 53, 835-841
17. Simko Peter, **Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked mead products and smoke flavouring food additives.** Journal of Chromatography B (2002), 770, 3-18.
18. Van Schanke, A; Holtz, F.; Van Der Meer, J.; P. Boon, J.; Ariese, F.; Stroomberg, G.; Van Den Berg, M.; M. Everaarts J. **Dose and time-dependent formation of biliary Benzo(a)pyrene metabolites in the marine flatfish Dab (*Limanda Limanda*).** Environmental Toxicology and Chemistry (2001), 20(8), 1641-1647.
19. Vives, I., Grimalt, J.O. **Method for integrated analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine compounds in fish liver.** Journal of Chromatography B. (2002), 768, 247-254.
20. Vives, I.; Grimalt, J.O.; Fernández, O.; Rosseland, B.; **Polycyclic aromatic hydrocarbons in fish from remote and high mountain lakes in Europe and Greenland,** Science of the Total Environment (2004), 324, 67-77.
21. Wang, Guangdi; Lee, Arthur S.; Lewis, Monique; Kamath, Burde; Archer, Renita K. **Accelerated solvent extraction and gas chromatography/mass spectrometry for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food samples.** Journal of Agricultural and Food Chemistry (1999), 47(3), 1062-1066.



**BIÓL. FRANCISCO INCERA UGALDE**  
Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado  
**Presente**

Me es grato informarle que la alumna **CLAUDIA LUIS AGUIRRE**, con número de cuenta 97557962, presentará su examen para optar por el grado de Maestro en Ciencias, vía **Examen General de Conocimientos** quien defenderá el proyecto de investigación titulado: "**Desarrollo y comparación de dos métodos analíticos para la extracción y purificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras biológicas**", ante el siguiente jurado:

Presidente	Dra. Luz Elena Vera Ávila	Facultad de Química, UNAM
1° Vocal	Dr. Roberto Martínez	Instituto de Química, UNAM
2° Vocal	Dra. Martha Patricia García Camacho	Facultad de Química, UNAM
3° Vocal	Dra. Silke Cram Heydrich	Instituto de Geografía, UNAM
Secretario	M. en C. Lucía del Carmen Márquez Alonso	Instituto de Química, UNAM
Primer Suplente	Dra. María del Pilar Cañizares Macías	Facultad de Química, UNAM
Segundo suplente	M. en C. María Guadalupe Ponce Vélez	Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

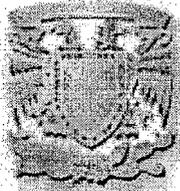
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a 16 de noviembre de 2005.  
A t e n t a m e n t e.



**DR. GUILLERMO DELGADO LAMAS**  
Coordinador del Programa

RECIBI ORIGINAL  
  
17 - Nov - 2005

c.c.p. Integrantes del Jurado  
Interesado  
Expediente  
Sección Escolar de la Coordinación de Posgrados, Facultad de Química



Universidad Nacional Autónoma de México

Secretaría General

Dirección General de Administración Escolar

Unidad de Administración del Posgrado

21073

## Historia Académica

<b>ALUMNO(A): LUIS AGUIRRE CLAUDIA</b>	<b>Nº Cta.: 97557962</b>
<b>PROGRAMA: 5-4005 : MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS</b>	

Año	Semes- tre	Enti- dad	Asig- natura	Grupo	Califi- cación	Crédi- tos	Folio	Nombre de la Asignatura	Nombre del Tema
2004	1	5	9902		AC	0	0	INGLES TRADUCCION	
2004	1	5	60063	0001	10	3	10202844	SIMETRIA EN QUIMICA	
2004	1	5	60065	0002	10	3	10202847	TERMODINAMICA QUIMICA I	
2004	1	5	60092	0001	10	3	10202856	METODOS DE SEPARACION I (CROMATOGRAFIA DE GASES)	
2004	1	5	60135	0001	9	3	10202867	ENLACE QUIMICO	
2004	1	5	60163	T122	10	3	10202892	TEMAS SELECTOS	ESTADISTICA I
2004	1	5	60170	0001	AC	6	5	TRABAJO DE INVESTIGACION	
2004	2	5	60093	0001	10	3	12347236	METODOS DE SEPARACION II (CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS)	
2004	2	5	60096	0001	10	3	12347238	METODOS ESPECTROSCOPICOS I (ESPECTROSCOPIAS DE MASAS)	
2004	2	5	60097	0001	9	3	12347240	METODOS ESPECTROSCOPICOS II (ESPECTROSCOPIAS ATOMICAS)	
2004	2	5	60163	T156	10	3	12347274	TEMAS SELECTOS	SIMETRIA QUIMICA II
2004	2	5	60164	T091	10	6	12347280	SEMINARIO DE TOPICOS SELECTOS	PREPARACION DE MUESTRAS BIOLOGICAS PARA LA DETERMINACION DE TRAZAS DE CO
2004	2	5	60169	0001	AC	6	5	TRABAJO DE INVESTIGACION	
2005	1	5	60060	0001	8	3	12398661	PRINCIPIOS DE ESTRUCTURA DE LA MATERIA	
2005	1	5	60162	0002	9	6	12398708	RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (FUNDAMENTOS DE INTERPRETACION)	
2005	1	5	60169	0001	AC	18	5	TRABAJO DE INVESTIGACION	
2005	2	5	60169	0001	AC	12	5	TRABAJO DE INVESTIGACION	

*Francisco Javier Incera Ugalde*

Biól. Francisco Javier Incera Ugalde  
Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado  
Ciudad Universitaria D.F. a 17 de Noviembre del

2005

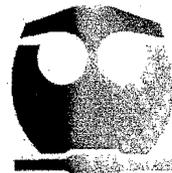
*Eduardo Guillermo Delgado Lamas*  
COORDINADOR DEL  
POSGRADO EN CIENCIAS  
QUIMICAS

Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas  
Coordinador del Programa de Posgrado de  
Ciencias Químicas



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



Dr. Guillermo Delgado Lamas  
Coordinador del Posgrado en Ciencias Químicas  
PRESENTE

Por medio del presente manifiesto haber leído el informe de trabajo de la alumna Claudia Luis Aguirre: "Desarrollo y comparación de dos métodos analíticos para la extracción y purificación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's) en muestras biológicas". Estoy de acuerdo con el contenido y la forma.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 16 de Noviembre de 2005

Dra. Araceli Peña Alvarez  
Tutora

RECIBIDO

'05 NOV 16 -6:22

COORDINACION DEL POSGRADO  
DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS QUIMICAS (CQM)