

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

“Aplicación de la Extracción Líquido-Líquido asistida por Saturación Salina para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en matrices acuosas por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con Detector de Fluorescencia”

Monografía previa a la obtención del título de licenciado  
en Ciencias Químicas, especialidad Química Analítica

BYRON STALIN ACOSTA HURTADO

Quito, 2016

## **CERTIFICACIÓN**

Certifico que la monografía de Licenciatura en Ciencias Químicas, especialidad Química Analítica, del señor Byron Stalin Acosta Hurtado, ha sido concluida de conformidad a las normas establecidas; por tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

M. Sc. Isabel Cipriani  
Directora de la monografía  
Quito, 14 diciembre del 2016

## **DEDICATORIA**

A Dios, a mi Mami, mi Hermana, mi Papa, mi esposa Cati♥ y a mi papa Manuel, porque siempre estuvieron presentes en cada paso de esta meta. Gracias por su amor y su apoyo

Especial agradecimiento al Dr. Marco Guijarro por su amistad, confianza y total colaboración en la realización de este proyecto y para mis amigos, del equipo técnico y de apoyo del Laboratorio LASA

Al personal de la PUCE por enseñarme a aprender y por creer en mí durante esta etapa.

## INDICE

INDICE DE FIGURAS.....	VI
INDICE DE TABLAS.....	VII
INDICE DE ECUACIONES.....	VIII
INDICE DE ANEXOS.....	VIII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1 DESARROLLO TEÓRICO.....	6
1.1 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAPs).....	6
1.1.1 GENERALIDADES.....	6
1.1.2 RUTAS DE EXPOSICIÓN Y METABOLISMO.....	7
1.1.3 EFECTOS EN LOS SERES VIVOS.....	9
1.1.4 CONTAMINACIÓN DEL AGUA POR HAPs.....	11
1.1.5 NORMATIVA AMBIENTAL.....	12
1.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAPs).....	14
1.2.1 CONSIDERACIONES DE MUESTREO Y ALMACENAMIENTO.....	17
1.2.2 EQUIPAMIENTO ADICIONAL.....	18
1.2.3 CANTIDAD DE MUESTRA REQUERIDA.....	19
1.2.4 SOLVENTES Y CANTIDADES REQUERIDAS.....	19
Aspectos de seguridad con el diclorometano.....	20
1.2.5 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN ALTERNATIVAS.....	23
Extracción líquido - líquido asistida por saturación con sales.....	26
1.3 VERIFICACIÓN PRÁCTICA.....	29
1.3.1 LIMPIEZA DEL MATERIAL.....	29
1.3.2 CONDICIONES INSTRUMENTALES.....	30
1.3.3 EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES DE EXTRACCIÓN.....	32
1.3.4 PROCESAMIENTO DE LOS CROMATOGRAMAS.....	35
1.3.5 TRATAMIENTO DE RESULTADOS.....	36
1.3.6 METODOLOGÍA ESTADÍSTICA.....	36
1.3.7 CALIBRACIÓN Y VERIFICACIÓN.....	37
1.3.8 PRUEBAS DE RECUPERACIÓN Y DATOS DE VALIDACIÓN.....	39

2 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA .....	48
FIGURAS .....	60
TABLAS .....	78
ANEXOS .....	103
INDICE DE ANEXOS.....	103
Equipos      108	
Materiales    108	
Reactivos    109	
Materiales de Referencia .....	109
Soluciones de calibración: .....	110
Soluciones de verificación de la calibración:.....	110
Soluciones de fortificación: .....	111
Condiciones de almacenamiento:.....	111

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructuras químicas de algunos HAPs(Umar 2015) .....	60
Figura 2 Cromatograma simultaneo UV/FLD (Gavilanes, 2013) .....	61
Figura 3 Aparatos para concentración Kuderna-Danish.....	62
Figura 4 Bomba de Vacío y Manifold para extracción SPE .....	63
Figura 5 Equipo Rotavapor (Imlab, 2016) .....	64
Figura 6 Embudos de separación.....	65
Figura 7 Concentrador de nitrógeno(bio-equip, 2016).....	65
Figura 8 Variantes del método QuEChERS .....	66
Figura 9 Cromatograma Estándar de calibración de HAPs .....	67
Figura 10 Cromatograma MRC Asequality.....	68
Figura 11 Espectro de Fluorescencia obtenido en la optimización de señales .....	69
Figura 12 Datos de calibración Naftaleno .....	70
Figura 13 Datos de calibración Acenafteno.....	70
Figura 14 Datos de calibración Fluoreno.....	71
Figura 15 Datos de calibración Fenantreno .....	71
Figura 16 Datos de calibración Antraceno .....	72
Figura 17 Datos de calibración Fluoranteno.....	72
Figura 18 Datos de calibración Pireno .....	73
Figura 19 Datos de calibración Benz(a)antraceno .....	73
Figura 20 Datos de calibración Criseno .....	74
Figura 21 Datos de calibración Benzo(b)fluoranteno .....	74
Figura 22 Datos de calibración Benzo(k)fluoranteno.....	75
Figura 23 Datos de calibración Benzo[a]pireno.....	75
Figura 24 Datos de calibración Dibenz(a,h)antraceno .....	76
Figura 25 Datos de calibración del Benzo(ghi)perileno .....	76
Figura 26 Datos de calibración Indeno(1,2,3-cd)pireno.....	77

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Contenido de Benzo(a)Pireno en algunos alimentos .....	78
Tabla 2: Grupos de HAPs prioritarios EFSA .....	79
Tabla 3: Potencial carcinógeno de algunos HAPs.....	79
Tabla 4: Clasificación de los HAPs según IARC .....	80
Tabla 5: Límites permisibles para la exposición al diclorometano.....	81
Tabla 6: Normas y Límites permisibles aplicables a los HAPs.....	82
Tabla 7: Resumen Técnicas Instrumentales para el análisis de HAPs .....	85
Tabla 8: Resumen de los métodos de extracción estandarizados para HAPs .....	86
Tabla 9: Precisión y Exactitud métodoEPA 8310 .....	87
Tabla 10: Desvío y Exactitud de Standard Methods 6440(APHA, 2012).....	88
Tabla 11: Criterios aceptación FoPT (TNI NELAC, 2016) .....	88
Tabla 12: Recuperación EPA8330 por SALLE y método tradicional .....	89
Tabla 13: Cantidad de agua adicionada según humedad de la muestra.....	89
Tabla 14: Condiciones instrumentales .....	90
Tabla 15: Tiempo de retención y longitudes de onda FLD .....	90
Tabla 16: Concentraciones Solución Madre y Stock.....	91
Tabla 17: Concentración de Estándares de Calibración .....	91
Tabla 18: Concentración Estándares de Verificación de la calibración .....	92
Tabla 19: Concentración de las soluciones de fortificación.....	92
Tabla 20: Concentración de las muestras fortificadas.....	93
Tabla 21: Test de recuperación SALLE en muestra fortificada con HAPs .....	93
Tabla 22: Datos de Validación e incertidumbre Naftaleno.....	94
Tabla 23: Datos de Validación e incertidumbre Acenafteno.....	94
Tabla 24: Datos de Validación e incertidumbre Fluoreno.....	95
Tabla 25: Datos de Validación e incertidumbre Fenantreno.....	95
Tabla 26: Datos de Validación e incertidumbre Antraceno.....	96
Tabla 27: Datos de Validación e incertidumbre Fluoranteno.....	96
Tabla 28: Datos de Validación e incertidumbre Pireno.....	97
Tabla 29: Datos de Validación e incertidumbre Benz(a)antraceno.....	97
Tabla 30: Datos de Validación e incertidumbre Criseno.....	98
Tabla 31: Datos de Validación e incertidumbre Benzo(b)fluoranteno.....	98

Tabla 32: Datos de Validación e incertidumbre Benzo(k)fluoranteno.....	99
Tabla 33 Datos de Validación e incertidumbre Benzo[a]pireno.....	99
Tabla 34: Datos de Validación e incertidumbre Dibenz(a,h)antraceno.....	100
Tabla 35: Datos de Validación e incertidumbre Benzo(ghi)perileno.....	100
Tabla 36: Datos de Validación e incertidumbre Indeno(1,2,3-cd)pireno.....	101
Tabla 37: Pendientes estándares de Calibración y Verificación.....	101
Tabla 38: Resumen de recuperaciones obtenidas en la verificación.....	102
Tabla 39: Resumen de Incertidumbre obtenidas en la verificación.....	102

### INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1 Cálculo de concentración de los analitos.....	36
--	----

### INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1 CERTIFICADO DE ANÁLISIS M8310-QC-ATI.....	105
ANEXO 2 CERTIFICADO DE ANÁLISIS M-PAH5504A99-5ML.....	106
ANEXO 3 INFORME DE PT ASEQUALITY.....	107
ANEXO 4 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS USADOS EN VERIFICACIÓN EXPERIMENTAL.....	108
ANEXO 5 PREPARACIÓN DE PATRONES DE REFERENCIA.....	110
ANEXO 6 PREPARACIÓN MUESTRAS DE REFERENCIA.....	113
ANEXO 6 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	114

## RESUMEN

Se desarrolló una metodología para la extracción líquido-líquido (agua/acetonitrilo) para 15 hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benz(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenz(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno, indeno(1,2,3-cd)pireno en matrices acuosas. La partición se consiguió por medio de la saturación de la mezcla con sulfato de sodio anhidro y el análisis del extracto se llevó a cabo por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detección de Fluorescencia (HPLC-FLD). Se evaluó el desempeño del método por medio de pruebas de interlaboratorio. Los resultados fueron satisfactorios para los 15 analitos con valores de Z entre (-1,04)y(+0,73). Se realizó la validación del método en 4 niveles de concentración en matrices de agua potable, agua natural y agua residual. En las muestras fortificadas los porcentajes de recuperación fueron del 92% al 61% con una media de 78%. Mientras que, en el material de referencia certificado la recuperación fue del 114% al 71% con una media de 91%. En todas las pruebas realizadas la incertidumbre fue muy homogénea, con una máxima de 23,1% y mínima de 9,3% la media global fue del 13,5%.

Palabras clave: Extracción, HAPs, HPLC-FLD, Muestras acuosas, Partición líquido-líquido.

## ABSTRACT

A liquid - liquid extraction method (water/acetonitrile) was developed for the determination of 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) naphthalene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene, chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, dibenz[a,h]anthracene, benzo[ghi]perylene, indeno[1,2,3-cd]pyrene in aqueous samples. Partitioning was achieved by saturation of the mixture with anhydrous sodium sulfate. The extract was analyzed by High Resolution Liquid Chromatography with Fluorescence Detection (HPLC-FLD). Method performance was evaluated by means of inter-laboratory proficiency testing. Results were satisfactory for all analytes, as Z scores were between (-1,04) and (+0,73). The method was validated in 4 concentration levels in drinking water, natural water and wastewater samples. In spiked samples, the recoveries were from 92% to 61% with a mean value of 78% while in certified reference material the recoveries were from 114% to 71% with a mean value of 91%. Uncertainty was very homogeneous for all tested concentrations. The uncertainties were from 23.1% to 9.3% the overall mean was 13.5%.

Keywords: Extraction, PAHs, HPLC-FLD, Liquid-liquid partition, Water samples.

## INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos o hidrocarburos aromáticos polinucleares mejor denominados como HAPs son compuestos orgánicos tóxicos, y cancerígenos (Food safety authority of Ireland, 2015). La realización de estos ensayos en el laboratorio entraña inherentemente un riesgo por el potencial peligro que los mismos analitos representan, pero también el análisis en si mismo conlleva riesgo por el empleo del diclorometano como solvente de extracción (NIOSH, 2016). Pese a la importancia analítica de esta familia de compuestos, en los métodos estandarizados no se han observado modificaciones fundamentales desde los años ochenta.

Debido a la normalización, los ensayos químicos y los laboratorios donde se realizan se han sujetado a diversas normas para demostrar competencias técnicas (ISO 17025), responsabilidad con el ambiente (ISO 14001), y con la salud del personal involucrado en los ensayos (OHSAS 18001). Esta tendencia ha hecho que se prefieran técnicas económicamente rentables, que empleen cantidades reducidas de reactivos y por ende generen pocos desechos, además que se busquen alternativas menos peligrosas para la salud y el ambiente.

La técnica *QuEChERS* (acrónimo en inglés de Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe; rápido fácil, económico, eficaz sólido y seguro) y otras similares como el US EPA 8330 (2007) hacen uso del fenómeno de partición que se observa en determinadas mezclas homogéneas de solventes luego de saturar la mezcla con una sal. El uso de esta propiedad permite en las extracciones líquido-líquido cambiar los tradicionales solventes no polares inmiscibles con el agua como el hexano y diclorometano por otros más polares y

particionables por acción de sales como el acetonitrilo, isopropanol y acetona. (Majors, 2009). Esta técnica presenta algunas ventajas analíticas:

- Eleva la recuperación de analitos altamente polares que no se podían con los métodos clásicos.
- Elimina la fase de cambio de solvente, que es la responsable de las bajas recuperaciones de los analitos más volátiles.
- Simplifica y facilita el procesamiento de la muestra.

(Lehotay, Anastassiades y Majors, 2010)

Este trabajo estudia las modificaciones realizadas a la técnica *QuEChERS* para emplearse en la extracción de 15 HAPs fluoróforos: naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benz(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenz(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno, indeno(1,2,3-cd)pireno en muestras acuosas.

La extracción es de tipo líquido-líquido directamente entre la muestra de agua y acetonitrilo, estos solventes normalmente miscibles se particionan luego de saturar la mezcla con sulfato de magnesio; de este modo, se sustituyó el diclorometano por acetonitrilo. El extracto obtenido se analizó por cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FLD).

El proyecto estudiado en este estudio abarcó desde la preparación y optimización de las condiciones instrumentales para la determinación cuantitativa de los analitos, el establecimiento de las condiciones para la fase de extracción, hasta la declaratoria de validación del método en base a estudios estadísticos. Una vez determinadas las condiciones instrumentales, establecida la función respuesta del equipo y optimizadas las fases de extracción, se evaluó la idoneidad del método a través de la participación en una ronda interlaboratorio que siga los criterios establecidos por el Servicio de Acreditación Ecuatoriano (SAE) y que cumpla los requisitos de la norma ISO 17043 para proveedores de *Proficiency Testing*. Cumplida esta evaluación se procedió a determinar los parámetros de validación en base al diseño experimental siguiente:

La función respuesta instrumental y la verificación de la exactitud se realizaron mediante patrones certificados, para cada compuesto se usaron de 3 a 6 niveles de concentración. La exactitud y precisión de la técnica se verificó con 4 niveles de concentración, para los 15 compuestos: Un nivel se comprobó con un Material de Referencia Certificado proveniente de la ronda de interlaboratorios Asequality abril 2016. Y los otros tres niveles fueron fortificaciones utilizando el PAH Mix M-8310-QC-ATI de Accustandard con adiciones en agua de consumo, natural y residual.

## **OBJETIVOS:**

### **General:**

Analizar las diferentes metodologías disponibles para la determinación cuantitativa de 15 hidrocarburos aromáticos policíclicos en matrices acuosas mediante extracción líquido-líquido asistida por saturación salina y cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de fluorescencia.

### **Específicos:**

- Estudiar las condiciones instrumentales óptimas para la cuantificación de naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benz(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenz(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno, e indeno(1,2,3-cd)pireno, mediante HPLC-FLD.
- Estudiar las condiciones óptimas de la extracción líquido-líquido asistida por saturación salina SALLE para la extracción de los 15 HAPs en matrices acuosas.
- Analizar el desempeño del método de análisis desarrollado en cuanto a exactitud, precisión y linealidad.

# 1 DESARROLLO TEÓRICO

## 1.1 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAPs)

### 1.1.1 GENERALIDADES.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son un grupo de más de 100 sustancias químicas diferentes (US ATSDR, 1996) (Baird y Cann, 2012), que contienen dos o más núcleos aromáticos fundidos formados por átomos de carbono e hidrogeno (Nollet y Toldra, 2012) en la **Figura1** se muestran algunos ejemplos, se forman naturalmente en combustibles como carbón, petróleo, gasolina, gas, o como productos de su combustión en atmosferas escasas de oxígeno entre los 500 a 900°C, o en la pirolisis de otros materiales orgánicos como madera, basura y tabaco (humo de cigarrillos). Los HAPs generados a partir de estas fuentes son mezclas de compuestos que pueden formar pequeñas partículas en el aire. La cocción a alta temperatura forma HAPs en la carne y otros alimentos (Department of Health & Human Services USA, 2013). Fuentes naturales de HAPs son los incendios forestales y volcanes (Nollet y Toldra, 2012).

Los HAPs de bajo peso molecular (dos y tres anillos) existen en la atmósfera predominantemente en la fase de vapor, mientras que los HAPs de múltiples anillos (cinco anillos o más) están en gran medida unidos a partículas. Los HAPs de peso molecular intermedio (cuatro anillos) se reparten entre las fases de vapor y partículas, dependiendo de la temperatura atmosférica. Se

considera que los HAPs unidos a partículas son muy peligrosos para la salud humana (WHO EU, 2010) (Baird y Cann, 2012).

Los HAPs han sido detectados también en el espacio, durante los últimos 20 años, los científicos del Centro de Investigación Ames de la NASA en Moffett Field, California, midieron y calcularon experimentalmente las firmas espectroscópicas de HAPs para rastrear y analizar la inesperada y extendida emisión IR de estos compuestos procedente del espacio profundo. Los científicos creen que más del 20 por ciento del carbono en el universo está ligado a esta extensa familia de compuestos (NASA, 2014).

Algunos HAPs se producen individualmente para fines en investigación o se utilizan para la fabricación de tintes, plásticos, pesticidas, explosivos y fármacos (US HHS ATSDR, 1995). El naftaleno es un HAPs que se produce comercialmente para fabricar bolas de naftalina y productos químicos (US HSS, CDC, 2013). El fenantreno también se ha utilizado para producir ácidos biliares, colesterol y esteroides (US EPA Phenanthrene, 1993). El grafeno que son moléculas de carbono planas o con geometrías espaciales como los fullerenos y nanotubos de carbono, también se han definido como hidrocarburos aromáticos policíclicos los cuales por sus propiedades físico químicas se ha planteado producirse para aplicaciones variadas (Soria, 2015).

### **1.1.2 RUTAS DE EXPOSICIÓN Y METABOLISMO.**

Las personas suelen estar expuestas a mezclas de HAPs. Las formas comunes de exposición son: el aire contaminado con gases de escape de vehículos a motor, humo de cigarrillo, humo de madera, o los vapores emitidos por carreteras de asfalto. Las personas toman HAPs cuando comen carnes a la parrilla o carbonizadas o alimentos en los que las partículas de HAPs se han asentado desde el aire (US HSS, CDC, 2013) (Baird y Cann, 2012). En la **Tabla 1** se muestra el contenido de HAPs en algunos alimentos.

El procesamiento industrial de los alimentos, como secado, calentamiento, ahumado, rostizado pueden también formar HAPs. Durante la producción de té, café y aceite, sus productos pueden contaminarse con HAPs durante las fases de secado, sin embargo, en el aceite los niveles pueden disminuir durante la desodorización y tratamiento con carbón (Nollet y Toldra, 2012). Tal como se espera de su modo de preparación, la carne y el pescado ahumados o a la parrilla con carbón vegetal contienen los mayores niveles de HAPs encontrados en alimentos. Sin embargo, las verduras de hoja verde como la lechuga y la espinaca pueden constituir incluso una fuente aún mayor de HAPs, debido a la deposición de estas sustancias desde la atmósfera sobre las hojas de las verduras mientras están creciendo (Baird y Cann, 2012). La conservación con ahumado, y en especial las técnicas tradicionales son unas de las que más destacan por aportar HAPs a los alimentos (Vives et al, 2001). La carne cruda, la leche, las aves de corral y los huevos normalmente no contendrán altos niveles de HAPs debido al rápido metabolismo de estos compuestos en los animales de los que se producen estos alimentos. Sin embargo, algunos organismos marinos, tales como moluscos bivalvos, como mejillones y ostras, se sabe que absorben y acumulan HAPs del agua contaminada (Food safety authority of Ireland, 2015).

En 2008, la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) calculó la exposición alimentaria humana a los HAPs basándose en datos suministrados por 17 países europeos. La exposición varió entre 235ng/día y 389ng/día para el benzo[a]pireno en consumidores promedio y alto, este valor aumenta a 1729ng/día y 3078ng/día, para la suma de los 8 HAPs prioritarios ver **Tabla2**. Los dos mayores contribuyentes a la exposición dietética fueron los cereales, los mariscos y los derivados de ambos. No obstante, para este estudio no se disponía datos sobre alimentos con contenido potencialmente elevado de HAPs, como los productos a base de barbacoa, ahumados y de carne asada. En los productos del mar, los HAPs no se acumulan en el músculo de los peces debido al rápido metabolismo, sino que se asocian principalmente con los moluscos y los productos procesados, como el pescado ahumado (Food safety authority of Ireland, 2015).

Después de que los HAPs son ingeridos, inhalados o, en algunos casos, absorbidos a través de la piel, el cuerpo los convierte en metabolitos que pasan fuera del cuerpo en la orina y las heces (US HSS, CDC, 2013). Durante la gestación atraviesan la placenta y se excretan en la leche materna.

El hígado y los riñones son los órganos que metabolizan principalmente los HAPs ingeridos, mediante mecanismo enzimático a través del citocromo P450 CYP otros órganos que los metabolizan son glándulas adrenales, testículos, tiroides, pulmones, piel, glándulas sebáceas, y el intestino delgado. Los HAPs se metabolizan primero como epóxidos, los que luego se convierten en derivados dihidrodioles y fenoles. La excreción se realiza vía bilis u orina después de la conjugación de los metabolitos con sulfatos y glucurónidos. Estudios en animales han encontrado que la vida media de excreción de los HAPs en orina y heces se encuentra entre 22 y 28 horas. Se ha encontrado que algunos metabolitos son los responsables de los efectos genotóxicos, cancerígenos y teratógenos al interactuar con el ADN (ASTDR Cases, 2009)(Food safety authority of Ireland, 2015).

### **1.1.3 EFECTOS EN LOS SERES VIVOS.**

El descubrimiento de los riesgos para la salud que tienen los HAPs data desde hace más de un siglo. En 1775, la aparición de cáncer de escroto en los deshollinadores se asoció al hollín alojado en las grietas de la piel de sus genitales (Baird y Cann, 2012). A mediados de la década de 1930, el descubrimiento de la carcinogenicidad del benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno y otros HAPs proporcionó el hito para la identificación y estimación de los HAPs en el medio ambiente (Patra, 2003). Desde 1964, los HAPs ya eran bien conocidos como cancerígenos (Nollet y Toldra, 2012). Los datos de estudios realizados en animales indican que varios HAPs pueden inducir una serie de efectos adversos, como la inmunotoxicidad, la genotoxicidad, la carcinogenicidad y la toxicidad reproductiva (que afecta tanto a varones como a mujeres) y pueden también influir en el desarrollo de la aterosclerosis (WHO EU, 2000). Incluso en

concentraciones relativamente bajas, su potencial cancerígeno es elevado (APHA, 2012).

Experimentos en ratones que fueron alimentados con altos niveles de HAPs durante el embarazo tuvieron dificultad para reproducirse y también lo hicieron sus hijos. Estos descendientes también presentaron tasas más altas de defectos de nacimiento y pesos corporales inferiores. Los estudios en animales también han demostrado que los HAPs pueden causar efectos nocivos sobre la piel, los fluidos corporales y la capacidad de combatir enfermedades después de una exposición a corto y largo plazo. Algunas personas que han respirado o tocado las mezclas de HAPs y otras sustancias químicas durante largos períodos de tiempo han desarrollado cáncer (US ATSDR, 1996).

Algunos HAPs han causado cáncer en animales de laboratorio cuando: los respiraron en el aire que los contenía (cáncer de pulmón), los ingerían en los alimentos (cáncer de estómago) benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno y dibenzo[a,h]antraceno o los aplicaban a su piel (cáncer de piel) (US ATSDR, 1996) (Patra, 2003). El benzo[a]pireno se utiliza a menudo como marcador para la exposición total a los HAPs carcinógenos, ya que su contribución al potencial carcinogénico total es alta en el rango de 51%-64%(WHO EU, 2010).

En 2008, el Panel sobre Contaminantes de la Cadena Alimentaria (CONTAM) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority EFSA), a petición de la Comisión Europea, revisó la información disponible relativa a la toxicidad por HAPs, haciendo hincapié en la idoneidad de utilizar el benzo[a]pireno como único marcador de la presencia y efecto de los HAPs en los alimentos. Una de las conclusiones de este panel fue que la caracterización del riesgo solo puede establecerse en aquellos HAPs para los que existe información acerca de su carcinogenicidad por vía oral. En dichos estudios se estableció 2 grupos que eran mejores indicadores de la incidencia de HAPs que el benzo[a]pireno por sí solo. A estos grupos se los denominó HAPs4 y HAPs8 (Pérez, et al., 2016) En la **Tabla 2** se listan los HAPs de cada grupo según EFSA.

En la **Tabla 3** se encuentran algunos HAPs organizados por su potencial carcinogénico y en la **Tabla 4** se encuentra la clasificación que la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (International Agency for Research on Cancer IARC), ha dado para algunos HAPs en cuanto a su carcinogenicidad.

La mayoría de las pruebas experimentales de carcinogenicidad de los HAPs en seres humanos se basa en estudios realizados sobre trabajadores ocupacionales expuestos a estos compuestos durante el procesamiento para la producción de coque, techos, refinado de petróleo o carbón (Patra, 2003).

#### **1.1.4 CONTAMINACIÓN DEL AGUA POR HAPs.**

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos también son importantes contaminantes del agua. Los HAPs entran en el medio acuático como consecuencia de los vertidos de petróleo desde tanques, refinerías y lugares de prospección mar adentro. En el agua potable, el nivel de HAPs alcanza valores de unas pocas partes por billón y, habitualmente, es una fuente poco representativa de estos compuestos para los seres humanos. Los HAPs más grandes se bioacumulan en los tejidos grasos de algunos organismos marinos, lo que se ha relacionado con la aparición de lesiones de hígado y tumores en algunos peces. Se piensa que los HAPs, los bifenilos policlorados y el insecticida Mirex juegan un papel en la devastación de las poblaciones de ballenas beluga (Baird y Cann, 2012).

La mayor fuente de contaminación de HAPs en el agua de consumo en países en vías de desarrollo frecuentemente se debe al alquitrán de hulla que se utiliza como protección de la corrosión en las tuberías de hierro de las líneas de distribución. El fluoranteno es el compuesto que aparece asociado más frecuentemente en este tipo de contaminación. El consumo y la exposición a los HAPs causada por esta fuente pueden igualar o exceder la cantidad que dejan otras vías por ejemplo los alimentos; pese a esto, el fluoranteno no es regulado debido a que las concentraciones que se encuentran en el agua potable, están por debajo de los límites que causan efectos sobre la salud. Los niveles de HAPs

en aguas subterráneas no contaminadas usualmente están en el rango de 0-5ng/l; Las concentraciones en aguas subterráneas contaminadas pueden superar los 10µg/l; y el intervalo de concentración típico para la suma de los HAPs en el agua potable es de aproximadamente 1ng/l - 11µg/l (WHO WS, 2003).

### 1.1.5 NORMATIVA AMBIENTAL.

La normativa ambiental internacional y nacional consideran los HAPs de diferentes formas según la matriz y la importancia que se le dé a uno o varios compuestos en base de la información disponible hasta el momento de su publicación, a la probabilidad de ocurrencia en determinadas fuentes o en base a datos históricos. Es por esto que se observan diferencias importantes en las regulaciones pese a que se traten de matrices similares.

En Ecuador, las tres normas principales que regulan la presencia de los HAPs en el ambiente son la norma ecuatoriana INEN 1108 para requisitos del agua potable, el Acuerdo Ministerial 28 que substituyó al “Libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria” mejor conocido como TULSMA (2015), que regula varios tipos de aguas y suelos. Y el “Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarburíferas” RAOHE del 2010 o decreto 1215 que regula las operaciones relacionadas con hidrocarburos, en la **Tabla 6** se muestran los distintos límites de varias normas. Internacionalmente la Organización Mundial de la Salud, ha sido de los entes que han realizado varias actualizaciones de la regulación hacia los HAPs, y es además una de las fuentes más referidas en otras normativas por ejemplo “National Primary Drinking Water Regulations”(2016) y el “Council Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption”(1998).

Las Normas Internacionales de la OMS para el agua potable de 1958 y 1963 no se referían a los HAPs. En 1971 se estableció que la concentración de Fluoranteno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo[a]pireno, 1,12 benzopireno, Indeno[1,2,3-cd]pireno) no debía exceder de 0,0002 mg/l.

Para 1984 el benzo[a]pireno era el único HAPs con suficiente evidencia toxicológica para poder establecer un valor, el cual se fijó en 0,00001 mg/l aunque el modelo matemático que se utilizó, implicó una considerable incertidumbre. En 1993 se establece el valor de referencia de 0,0007 mg/l para el benzo[a]pireno, que corresponde a un riesgo de máximo de cáncer de  $10^{-5}$ . También se recomendó suspender el uso de materiales a base de alquitrán de hulla y similares para revestimientos de tuberías y revestimientos en tanques de almacenamiento. Aunque en esta revisión se calculó un valor límite para fluoranteno, éste fue significativamente superior a las concentraciones encontradas en el agua potable, por lo cual se definió que no representaría un peligro para salud humana. Otros HAPs, no han sido incluidos dado que hay pocos datos sobre la toxicidad oral y las potencias carcinógenas relativas se determinaron mediante datos de los estudios dérmicos y otros, Estas recomendaciones y el valor límite para el benzo[a]pireno se mantuvieron y se confirmaron en base a nuevos estudios en las publicaciones subsiguientes de 1998, 2004, 2011 (WHO, 2016).

Como se puede observar en la **Tabla 6** la normativa ambiental ecuatoriana ha ido cambiando el modo de ver el riesgo que suponen los HAPs y revisando los límites de control en aguas de la misma manera que ha desarrollado sus criterios la Organización mundial de la salud. Por ejemplo, en el TULAS del 2001 el límite de benzo[a]pireno en aguas de consumo era de 0,01ug/l similar al de la OMS de 1984, a la Directiva de la Unión Europea de 1998 y a las regulaciones de Wales e Inglaterra del 2000 y 2010 respectivamente. Del mismo modo la RAOHE en la revisión del 2010 no se modificó los anexos vigentes desde el 2001 con un límite en inmisiones en promedio anual de 0,0002mg/l para la suma de los 6 HAPs controlados en esta norma. Cinco de estos 6 compuestos aparecen en las directrices de la OMS de 1971 con un límite de 0,0002mg/l la excepción es el Benzo(ghi)perileno (1,12 benzopelileno), mientras que en la OMS se cita al 1,12 benzpyrene (WHO, 2016).

## 1.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAPs)

En los últimos 40 años, un amplio número de técnicas para la determinación de HAPs han sido publicadas. Los procedimientos analíticos usados mayormente envuelven básicamente extracción, clean-up y la determinación mediante técnicas como cromatografía de gases con detección de ionización de flama (GC-FID), o con detector de masas específicas (GC-MSD), y cromatografía líquida con detector de ultravioleta y/o fluorescencia (HPLC-UV/FLD) son las más empleadas (Nollet y Toldra, 2012). En la **Tabla 7** se muestran las técnicas instrumentales que usan algunos métodos estandarizados para la determinación de HAPs. En la bibliografía analítica los HAPs se enmarcan dentro de varias familias de analitos que tienen características químicas parecidas, de este modo, los métodos los pueden citar directamente como, HAPs, PNAs, o como miembros de las bases neutras o compuestos semivolátiles.

Previo al análisis instrumental a las muestras se les debe realizar una exhaustiva preparación, este trabajo requiere tediosos pasos de extracción, clean-up y concentración a modo de aislar los químicos presentes en el orden de ng (Nollet y Toldra, 2012), antes de poder transferir las muestras a viales para su determinación. Por ejemplo, los métodos EPA 8310, 8100 y 8270 que son técnicas puramente instrumentales, deben hacer uso de otros métodos para la extracción de la muestra como el 3510C, 3520C y 3535A para los HAPs.

Para el caso de las técnicas usadas por GC, lo habitual es usar columnas de polaridad baja a intermedia como las DB1 (100% Dimethylpolysiloxane) o DB5 (5%-Phenyl-methylpolysiloxane) que soporten temperaturas elevadas de trabajo para la elución de los HAPs más pesados como el dibenz(a,h)antraceno e indeno(1,2,3-cd)pireno, en las técnicas por GC hay una alta posibilidad de coelución total o parcial de compuestos, el grupo crítico que no se resuelven fácilmente incluso en columnas capilares son los 3 benzo(b,j,k)fluorantenos. Las

columnas empacadas detalladas en el método EPA 8100 y SM 6440 no pueden resolver adecuadamente los siguientes cuatro pares de compuestos (APHA 2012)

- Antraceno y Fenantreno.
- Criseno y Benzo(a)antraceno.
- Benzo(b)fluoranteno y Benzo(k)fluoranteno.
- Dibenz(a, h)antraceno e Indeno(1,2,3-cd)pireno.

El método por HPLC, resuelve completamente los picos. La fase móvil es gradiente de agua-acetonitrilo (US EPA 8310, 1986) (APHA, 2012). Los HAPs por HPLC pueden ser analizados por la absorción de radiación ultravioleta UV a 254 nm o por fluorescencia FLD (Fluorescence Detector) la excitación se realiza a 280 nm y el pico de emisión a longitudes mayores a los 389 nm. La mayoría de los HAPs son fluoróforos naturales, por lo que la detección por FLD es directa sin derivatización, la duración y el espectro de fluorescencia dependen de la polaridad del medio en el que está disuelto. Contaminantes en el solvente y el oxígeno pueden actuar como supresores disminuyendo el rendimiento cuántico de la fluorescencia. El acenaftileno (APHA, 2012) y el Ciclopenta(cd)pireno son dos compuestos que no presentan fluorescencia su detección requiere asistencia de un detector adicional. Comparativamente la detección por FLD es más sensible y selectiva que la UV. En matrices complejas la detección UV no puede discriminar la señal de ciertas sustancias que pueden interferir en la identificación, cuantificación y separación de los HAPs. En los detectores UV de arreglo de diodos DAD (Diode Array Detector) el problema puede persistir, pero la posibilidad de obtener espectros instantáneos durante la corrida, puede ayudar en la identificación del compuesto (Nollet y Toldra, 2012) en la **Figura 2** se observa el cromatograma obtenido por (Gavilanes, 2013) donde se puede ver la diferencia en la sensibilidad de los detectores UV y FLD.

Otras técnicas basadas en inmunoensayos también se han desarrollado, comercialmente existen kits ELISA cuyo principio se basa en que los HAPs presentes en una muestra reaccionen específicamente con anticuerpos presentes en el kit y generen color. La concentración es determinada por medio de un espectrofotómetro o fotómetro a 450 nm. Sin embargo, estas técnicas, no hacen

diferenciación exclusiva de los compuestos detectados sino de grupos de HAPs normalmente calibrados para reportar todas las especies existentes como fenantreno ó benzo(a)pireno.

Un ejemplo de estos ensayos es el método US EPA 4035 es un procedimiento de screening para determinar HAPs a concentraciones superiores a 1 mg / kg. El método EPA 4035 proporciona una estimación de la concentración de HAPs por comparación con un patrón de HAPs. El kit usado para la evaluación por este método es más sensible a los HAPs de tres anillos (fenantreno, antraceno, fluoreno) y cuatro anillos (benzo(a)antraceno, criseno, fluoranteno, pireno). Y también reconoce la mayoría de compuestos con cinco y seis de anillos. En los casos en que se requiere la concentración exacta de HAPs, deben usarse técnicas cuantitativas como los métodos 8310, 8270 o 8100. (US EPA 4035, 1996). Abraxis y “Modern Water” son algunos de los fabricantes de estos kits.

En las normativas ecuatorianas se establecen como procedimientos de referencia, la última revisión de los métodos listados en los “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” de la American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF). En (TULSMA, 2015) (DMQ Resolución 2, 2014) (INEN 1108, 2014). Como método alternativo solo para el caso de la (RAOHE Decreto 1215, 2010).se propone el DIN 38407-F8.

A pesar de este acápite, existe una variedad de metodologías aplicables para los HAPs en matriz aguas, por ejemplo en la normativa ISO (International Organization for Standardization), y ASTM (American Society for Testing and Materials) se han publicado los métodos: EN ISO 17993:2002, ISO 7981-2:2005, ISO 7981-1:2005 y ASTM: D5412 (European Commission Joint Research Centre, 2011) los cuales son poco conocidos en nuestro medio, comparándolos con los métodos EPA(United States Environmental Protection Agency) que se emplean habitualmente como referencias en los laboratorios acreditados en el país.

Los métodos EPA, para el análisis de HAPs en agua, cuyas revisiones más recientes fueron publicados en su mayoría entre los años 80s y 90s; están en vigencia en la actualidad. Y se emplean como base en programas de intercomparación y en la operación regular de laboratorios analíticos dentro y fuera de los Estados Unidos. En todas estas metodologías, pese a que usan técnicas instrumentales diversas y han sido emitidos por organismos de estandarización diferentes, se pueden encontrar dentro de ellas algunas similitudes en la **Tabla 7 y 8**.

Típicamente la preparación de la muestra es lo que limita la capacidad operativa del laboratorio, en función del número de extracciones simultáneas que se pueden realizar y número de concentradores disponibles, además del espacio y tiempo para realizar el procesamiento de la muestra.

Dependiendo del método escogido, este paso puede ser de 40 a 60 min por muestra para inyección en GC y si los extractos se analizarán por HPLC, es necesario agregar un paso de cambio de solvente, esto se realiza en el mismo equipo concentrador y puede tomar unos 20min adicionales. El proceso de concentración y cambio de solvente debe ser lento y cuidadosamente realizado ya que los HAPs más livianos son muy volátiles, algunos subliman como el caso del naftaleno y son arrastrados por el solvente durante la evaporación y la recuperación de estos disminuye.

### **1.2.1 CONSIDERACIONES DE MUESTREO Y ALMACENAMIENTO**

Los métodos de análisis para HAPs comparten aproximadamente los mismos criterios de muestreo y almacenamiento. Las muestras y extractos se deben recoger en botellas de vidrio ámbar (o botellas envueltas en papel de aluminio) para proteger los HAPs en muestras y extractos de la descomposición fotolítica. Los muestreos compuestos deben ser realizados con botellas refrigeradas. Las aguas potables se deben declorar con 100 mg de tiosulfato de sodio por litro de muestra y mezclar bien. Para conservar ajustar el pH de la muestra a menos de 2 con HCl 6N. Almacenan las muestras a 4°C lejos de la luz

hasta el análisis. El tiempo de almacenamiento máximo 7 días como muestra y un plazo máximo de 30 a 40 días en forma de extractos (US EPA 3510, 1996) (US EPA 610, 1984) (US EPA 550, 1990) (US EPA 1625, 1984) y (APHA, 2012).

### 1.2.2 EQUIPAMIENTO ADICIONAL

En la **Tabla 8** se puede ver un resumen de los pasos involucrados en los métodos de extracción para HAPs en muestras líquidas. Para los métodos especificados además del instrumental analítico, HPLC, GC, etc. Se requieren equipos y materiales necesarios para la extracción. A continuación, se listan algunos de ellos:

- Equipos de destilación – concentración Kuderna Danish (KD).**Figura 3.**
- Manifold y bomba de vacío para el SPE.**Figura 4.**
- Rotavapor usado como sustituto del KD.**Figura 5.**
- Embudos de separación.**Figura 6.**
- Evaporador concentrador por flujo de nitrógeno (NOAA 130.30, 1998).**Figura 7.**

Los equipos referidos en los métodos no siempre son adquiridos por los laboratorios, algunos laboratorios emplean otros equipos como sustitutos de equipos específicos. Por ejemplo laboratorios que hacen detergentes, FAMEs, aceites y grasas, suelen tener entre su equipamiento un rotavapor este por ejemplo se suele usar como sustituto del Kuderna Danish (Nollet y Toldra, 2012). O se prepara un sistema sencillo con tubos de ensayo gradillas y un tanque de gas comprimido para realizar la concentración de los extractos. Todos estos con algunos aspectos a considerar.

Utilizar un concentrador Kuderna-Danish (KD) o un rotavapor para concentrar el extracto depende del punto de ebullición de los compuestos de interés, su capacidad para sublimar y el tiempo de análisis. La concentración con KD toma más tiempo que la evaporación rotativa, pero hay menos pérdida por

evaporación y este método es aplicable a compuestos de bajo punto de ebullición como a compuestos de alto punto de ebullición. Este método es capaz de concentrar las muestras hasta unos pocos ml. Para una mayor concentración, se debe utilizar una columna micro-Snyder o evaporarse bajo una corriente de nitrógeno. La evaporación bajo nitrógeno gaseoso puede causar pérdida por evaporación de compuestos de bajo punto de ebullición. Sin embargo, el método de la columna micro-Snyder puede concentrar muestras que contienen compuestos de bajo punto de ebullición a volúmenes de 0,5 ml. El evaporador rotatorio o rotavapor puede concentrar grandes volúmenes de muestras en un período de tiempo relativamente corto. Sin embargo, tiene grandes pérdidas por evaporación y no es adecuado para compuestos de bajo punto de ebullición (Ministry of the Environment Japan, 2016).

### **1.2.3 CANTIDAD DE MUESTRA REQUERIDA**

Otro aspecto a considerar en los métodos es la cantidad de muestra, para las matrices acuosas todos los métodos requieren cantidades grandes de muestra alrededor de 1litro, significa que el número de botellas de muestras recolectadas debe ser suficiente para alcanzar para todos los ensayos y con el consiguiente espacio que será necesario para transportar estas botellas refrigeradas, o los costos de envío adicionales que se pueden necesitar.

### **1.2.4 SOLVENTES Y CANTIDADES REQUERIDAS**

Las cantidades de solventes que se usan están entre 100 y 400ml o más por muestra. Posteriormente tras la concentración este volumen de solventes se debe reducir a 1ml o menos. El solvente es recuperable parcialmente en los rotavapor o los KD más costosos ya que se agregan más piezas al sistema para que tengan esa función.

El solvente recuperado no siempre es reutilizable ya que puede arrastrar residuos de analitos y contaminar los blancos o muestras. Si se usa evaporador de nitrógeno no se recupera nada.

Si bien en las técnicas instrumentales hay diferentes opciones para escoger, cuando se trata de solventes de extracción para análisis de los HAPs no ocurre lo mismo. En los métodos citados en el literal 1.2.1, se puede ver que el solvente primario de extracción es el diclorometano tanto en la extracción líquido - líquido o como desorbente en la extracción en fase sólida SPE. Este reiterativo uso del diclorometano en métodos de diversa índole y origen no es coincidencia, su elevado momento de dipolo que le otorga un gran poder disolvente de un amplio rango de sustancias orgánicas polares y no polares no solo los HAPs, sino pesticidas clorados y fosforados, PCBs, Fenoles, etc. Su baja miscibilidad en agua permite usarlo directamente en extracciones líquido - líquido secándolo directamente con sulfato de sodio.

El bajo punto de ebullición y alta volatilidad permiten realizar concentración de muestras y cambios de solvente de manera aceptable y a bajas temperaturas. Estas características además de su bajo costo lo hacen ideal para extracción de múltiples analitos y permite el uso directo en cromatografía de gases, mientras que para HPLC se requiere intercambio con acetonitrilo.

### **Aspectos de seguridad con el diclorometano.**

El literal quinto de los doce principios de la química verde dice: Disolventes y auxiliares más seguros: El uso de sustancias auxiliares (por ejemplo, disolventes, agentes de separación, etc.) debe hacerse innecesario cuando sea posible e inocuo cuando se usa (Sigma Aldrich, 2016).

Pese a todas las ventajas analíticas que representa el uso del diclorometano estas, se ven cuestionablemente mermadas, al tomar en cuenta el riesgo para la salud que implica su uso.

Los efectos agudos (a corto plazo) de la inhalación de cloruro de metileno en seres humanos consisten principalmente en efectos del sistema nervioso incluyendo disminución de las funciones visuales, auditivas y motoras,

(reversibles), también irrita la nariz y la garganta a altas concentraciones. Los niveles extremadamente altos pueden ser fatales para los seres humanos. Los efectos de la exposición crónica (a largo plazo) al cloruro de metileno sugieren que afecta el sistema nervioso central en humanos y animales causando dolores de cabeza, mareos, náuseas y pérdida de memoria. Los estudios en animales indican que produce efectos también sobre el hígado, el riñón, y el sistema cardiovascular; eleva la frecuencia de cáncer de hígado, pulmón y tumores benignos de las glándulas mamarias, además atraviesa la barrera placentaria y se han observado variaciones esqueléticas menores y pesos corporales fetales disminuidos. (EPA, 2000). Los datos en humanos no son concluyentes con respecto al cáncer. EPA considera que el cloruro de metileno es un probable carcinógeno humano (grupo B2) (US EPA, 2000). El IARC International Agency for Research on Cancer lo clasificó en el grupo 2A como posible cancerígeno ver **Tabla 4** (IARC Classification 1-117, 2016) (IARC Monograph Vol71, 1999).

El IARC analizó el caso de 3 laboratorios entre 1978 y 1989 acerca del uso del diclorometano. En el estudio se realizaron mediciones de la concentración en la atmósfera. El personal expuesto al solvente fueron los técnicos de laboratorio y el personal de preparación de las muestras, las concentraciones que se obtuvieron fueron:

- 23-172 mg/m<sup>3</sup> aire
- 236-455 mg/m<sup>3</sup> aire
- 3-29 mg/m<sup>3</sup> aire

(IARC, 1999).

Como se puede ver en la **Tabla 5** es factible que en el ambiente del laboratorio se puedan alcanzar niveles de diclorometano por encima de los límites de exposición regulados y recomendados. En otras áreas de la industria, los organismos de control han prohibido el uso del diclorometano por ejemplo: En 1989 la FDA prohibió el uso de diclorometano en sprays para el cabello (IARC, 1999), En febrero de 2013, OSHA y NIOSH advirtieron que al menos 14 restauradores de bañeras han muerto desde el 2000 por exposición al diclorometano. (OSHA, 2013) En la Unión Europea desde el 2010, se prohibió los

decapantes de pintura con una concentración de diclorometano igual o superior al 0,1% en peso (UE, 2010).

No existe información de la evaluación de los riesgos químicos en el Ecuador para específicamente el área de laboratorios, sin embargo, se puede fácilmente observar en empresas locales numerosos factores de riesgo que pueden exponer a los analistas no solo al diclorometano sino también a otros reactivos peligrosos, algunos factores son los siguientes:

- Poco interés y desconocimiento de muchos analistas en temas de seguridad, falta de manejo de MSDS de los reactivos que se utilizan y las pocas, limitadas o inexistentes políticas de seguridad en varios sitios de trabajo.
- La falta de sistemas de ventilación adecuados, el hacinamiento en determinados sitios del laboratorio, y la posibilidad de contaminación cruzada de las áreas analíticas hacia las de oficina.
- El mantenimiento deficiente en las sorbonas (campanas o cámaras de gases), la falta de evaluación periódica de la velocidad succión y por ende la inexistencia de información que permita evaluar la operación de las sorbonas según estándares de seguridad internacionales.
- La excesiva confianza en la efectividad los equipos de protección personal como guantes y respiradores (mascarillas), y el uso de estos de manera anti técnica, inadecuada o fuera de especificaciones. Por ejemplo: La concentración del umbral de olor suele usarse como el punto para realizar el cambio de cartuchos de los respiradores (mascarillas). En el caso del diclorometano es 200ppm casi el doble de la concentración máxima de exposición a corto plazo (STEL) 125 ppm por 15min.
- La falta de información técnica de la resistencia y permeabilidad de los guantes vendidos localmente o fabricados de materiales inadecuados. Por ejemplo: Las hojas de seguridad recomiendan para el diclorometano u otros halogenados el uso de guantes de polivinil alcohol (PVA) (Avantor SDS, 2015) material más costoso que el nitrilo y

que no se encuentran, ni ofrecen por los distribuidores del país actualmente.

Si bien en base a validaciones algunos laboratorios han decidido cambiar el diclorometano para las extracciones líquido - líquido por otros solventes como hexano el cual es muy favorable para el uso en cromatografía de gases, en varios casos no se ha logrado superar la necesidad de usar procedimientos de concentración. Para el caso del análisis por HPLC el cambio de solvente por acetonitrilo para inyectar el extracto no ha podido ser superado con el uso del hexano, esto conlleva los ya discutidos efectos sobre el tiempo de procesamiento de la muestra y las pérdidas de compuestos volátiles.

### 1.2.5 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN ALTERNATIVAS

En el campo de matrices sólidas y alimentos para el análisis de HAPs se ha introducido y usado técnicas como la extracción asistida por microondas, ultrasónicas, extracción líquida presurizada, SPE, SPME, extracción con barras de agitación adsorptivas, con fluidos supercríticos, extracción acelerada con solvente y diversos equipos para la automatización o simplificación de extracciones complejas o largas como micro Soxhlet y otras como los *QuEChERS* (Nollet y Toldra, 2012). Algunas de estas técnicas se han estandarizado y otras son promovidas por sus fabricantes o inventores.

Para el caso del análisis de matrices acuosas, como se pudo evidenciar los en la sección anterior, no se han observado cambios significativos en las técnicas de extracción estandarizadas para HAPs desde los años 80 hasta la revisión en el 2012 del Standard Methods, lo que se puede encontrar son mejoras en los controles de calidad; pero aun dejando una fuerte desvinculación hacia las capacidades de la instrumentación actual y las mejoras en la exactitud, selectividad y sensibilidad de estas técnicas que son la base del desarrollo de algunos métodos de extracción nuevos. Por ejemplo: En el Standard Methods 6440B del 2012 ver la **Tabla 10** donde se muestra la exactitud o recuperación

esperada del método que está entre el 41% y 78% con promedio del 62% que son los mismos valores que muestran en la **Tabla 9** que se encuentra en el método EPA 8310 de 1986, esto pese a que hace tiempo se observan mejoras en la exactitud de los analitos considerados en los Fields of Proficiency Testing (FoPT) las cuales establecen los límites de aceptación de las pruebas interlaboratorio según las directrices del The NELAC Institute (TNI-NELAC National Environmental Laboratory Accreditation Conference) donde la recuperación en rondas interlaboratorio para los HAPs va del 67% al 85% con una media del 80% ver **Tabla 11**

Con relación a la seguridad, tampoco han existido propuestas de los entes de estandarización para la sustitución del diclorometano, pese a las consideraciones ya expuestas. De esta manera parece que se ha dejado el desarrollo de metodologías para aplicación en el tipo de matrices líquidas.

Sin embargo en otras áreas del campo analítico se ha introducido cambios importantes, tal es el caso de los pesticidas. En 2007 y 2008 respectivamente, el Association of Official Analytical Chemists (AOAC) y el European Committee for Standardization (CEN) adoptaron para la extracción de pesticidas multiclase en frutas y verduras un método basado en lo que se denomina extracción líquido - líquido asistida por saturación con sales o (SALLE en inglés), a este modo de extracción se le denominó *QuEChERS* desde ese entonces se han visto múltiples publicaciones alterando esta técnica para diferentes tipos de analitos y matrices.

Los HAPs no han sido la excepción, es así que a partir de la técnica *QuEChERS*, han surgido estudios para la extracción de HAPs en matrices diversas como: suelos (Zhao y Zhai, 2011) (Pule, et al., 2012), mariscos (Gratz, et al., 2010) (Young. et al., 2011) (Pfannkoch et al., 2010), pescado (Smith y Lynam, 2012), (Pule, et al., 2012), frutas, vegetales, alimentos de origen animal, salmón alto en grasa (Agilent Technologies, 2014).

Otros analitos determinados a partir de esta técnica son pesticidas, antibióticos, desinfectantes, micotoxinas, medicamentos veterinarios y otros se han sido extraídos de sedimentos, frutas, verduras, carnes, pescado, alimentos de

animales de granja, especias, jugos, leches, sangre, miel, suplementos dietéticos botánicos, plantas, tejidos animales, (Agilent Technologies, 2014). Algunos fármacos y drogas de abuso también se han analizado en sangre entera, vino e incluso suelos (Lehotay, Anastassiades y Majors, 2010).

Entre estos trabajos, el más completo y detallado es el realizado por técnicos del Centro de Química Forense de la FDA (Food and Drug Administration), Departamento de Química Analítica del CAES (The Connecticut Agricultural Experiment Station) y de la División de Servicios de Laboratorio del Departamento de Agricultura de Minnesota. En el 2010 estos científicos emplearon un método de extracción basado en *QuEChERS* para realizar un barrido de la presencia de HAPs en algunos mariscos. Las pruebas de recuperación de los quince HAPs analizados en tres niveles para cada matriz, dieron recuperaciones que oscilan entre el 78-99%. En este caso se omitió el segundo paso de purificación del extracto o dSPE ya que las pruebas demostraron que el aporte a la cuantificación e identificación no justificaba su uso. En el ensayo se emplearon kits buffered *QuEChERS* extraction (AOAC Method 2007.01, Agilent p/n 5982-5755) con 6 g de Sulfato de magnesio anhidro y 1,5 g de acetato de sodio (Gratz, et al., 2010).

## **Extracción líquido - líquido asistida por saturación con sales**

La preparación de las muestras para análisis de pesticidas, utilizó tradicionalmente la extracción líquido-sólido seguido de extracción líquido-líquido y, más recientemente, la extracción en fase sólida (SPE) para aislar los plaguicidas de interés. En 2003, basándose en las técnicas de extracción del pasado, químicos del United States Department of Agriculture (USDA) introdujeron una técnica que era simple pero que efectivamente aisla trazas de plaguicidas de una variedad de frutas y hortalizas. Soportándose de las fuertes mejoras en la sensibilidad y selectividad de las técnicas de GC-MS y HPLC-MS y más recientemente de sus contrapartes MS-MS. A esta técnica se llamó *QuEChERS* (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe), los dos químicos que la desarrollaron y llevaron la técnica a las organizaciones internacionales de validación y acreditación AOAC y CEN fueron los doctores Steven J. Lehotay del USDA en Filadelfia, Pennsylvania, EE.UU. y Michelangelo Anastassiades de Chemisches und Veterinaruntersuchungsamt, Stuttgart, Alemania, quienes trabajaron juntos en el laboratorio del USDA de 2000 a 2002. La primera publicación del método *QuEChERS* fue en el año 2003, la técnica ha crecido hasta convertirse en la técnica estándar de preparación de muestras de plaguicidas en frutas y hortalizas en laboratorios de todo el mundo (Lehotay, Anastassiades y Majors, 2010).

Los *QuEChERS* son la aplicación analítica de una técnica antiguamente usada, mediante la cual se logra la separación total o parcial de mezclas entre sustancias miscibles por medio de saturación de la mezcla con sales, similar al principio que se emplea por ejemplo para análisis de proteínas, o para romper emulsiones formadas en la extracción líquido - líquido tradicional o para mejorar el rendimiento de las extracciones de VOCs por Headspace, Purgue and Trap o incluso en recetas de cocina como el pochado o escalfado de huevos. Este principio de separación, se le ha denominado extracción líquido - líquido asistida por saturación con sales o por salinización (SALLE) (Majors, 2009) tampoco es nueva en el campo analítico de matrices acuosas, el método US EPA 8330 (2007)

se usa el mismo principio para determinar explosivos nitroaromáticos, nitraminas y ésteres nitrato en aguas y otras matrices por medio de HPLC.

En el US EPA 8330 se produce la partición de agua y acetonitrilo por acción únicamente de cloruro de sodio; en los *QuEChERS* el mismo efecto se logra con sulfato de magnesio. Otros investigadores han realizado este tipo de extracción por medio de varias sales las más comunes han sido cloruros y sulfatos e incluso azúcares en mezclas de agua con solventes como acetona, isopropanol, etanol, metanol. Y así también las aplicaciones han sido diversas, por ejemplo: En la extracción de quelatos metálicos para análisis por absorción atómica mediante extracción con acetona, se probaron 79 agentes de salinización y se concluyó que para el sistema agua-acetona los más efectivos fueron cloruro de calcio, cloruro de magnesio y sacarosa (Majors, 2009).

Comparativamente el método US EPA 8330 y los *QuEChERS*, ambos no requieren instrumental complejo, ni adicional al que se suele encontrar en cualquier laboratorio y el procedimiento es sencillo. Pese a esto los *QuEChERS* se han vuelto muy populares porque tienen una alta recuperación, y usan cantidades pequeñas de muestras (10-15g), solventes (10-15 ml de acetonitrilo) y sales (4-6g de sulfato de magnesio) además estas proporciones se pueden variar según la necesidad sin pérdidas significativas en la eficiencia (Waters 720003048ES, 2012) (Lehotay, Anastassiades y Majors, 2010) (AOAC, 2007). En el caso del US EPA 8330A/B la partición lograda por acción del cloruro de sodio no es total, se usan 770 ml de la muestra de agua, 164 ml de acetonitrilo y 251,3g de cloruro de sodio. Una vez lograda la partición, en el agua queda en solución todavía, una gran cantidad del acetonitrilo adicionado a la muestra; y apenas se recuperan unos pocos mililitros como extracto (US EPA 8330B, 200). Sin embargo del poco rendimiento de la separación, el efecto conseguido es suficiente para determinar eficientemente analitos nitroaromáticos que son compuestos explosivos, la cual puede ser la razón porque no se mejoró el rendimiento de la extracción. En la **Tabla 12** se puede observar la comparación en las recuperaciones de los analitos del 8330 por SALLE en comparación con técnicas líquido-líquido tradicionales.

En el procedimiento *QuEChERS*, básicamente la muestra se homogeniza en agua, la cantidad de agua usada depende de la cantidad de humedad inicial de la muestra ver **Tabla 13**. Se adiciona acetonitrilo lo que forma una mezcla homogénea con el agua, luego esta se separa al disolver una cantidad alta de sulfato de magnesio anhidro en la mezcla. En la variante del AOAC se tampona la mezcla por medio de acetato y ácido acético 1% y en la variante del CEN esta función se la hace con citrato y adicionalmente se usa cloruro de sodio. El uso del efecto tampón de estas sales sirve para mejorar el rendimiento de la extracción de unos 10 pesticidas específicos, que tienen mejores recuperaciones en medio ácido pH 5. Hasta aquí es a fase extractiva, a esta se le suma una fase de purificación del extracto por una variante del SPE llamada dispersive SPE dSPE y queda listo para el análisis instrumental. En algunos casos el solvente se debe intercambiar por uno admisible para la técnica como para el caso unos tipos de GC en la **Figura 8** se pueden ver las 3 variantes del método *QuEChERS*(Lehotay, Anastassiades y Majors, 2010)(Waters, 2012).

Anastassiades ha comparado los *QuEChERS* con el método tradicional de determinación de pesticidas utilizado ampliamente en toda Europa durante 15-20 años y se calcula una reducción aproximada del 95% en el consumo de disolvente (10m frente a 535 ml), una reducción aproximada del 95% en los costos de consumibles, y un 90% aproximado de reducción en el tiempo. El número de laboratorios que utilizan *QuEChERS* ha ido aumentando continuamente hasta alcanzar aproximadamente el 40% en 2009. Y entre los laboratorios privados, en los que los aspectos financieros pesan aún más, la tasa de adaptación a *QuEChERS* es supuestamente mayor y cerca del 70%. (Lehotay, Anastassiades y Majors, 2010).

### 1.3 VERIFICACIÓN PRÁCTICA

Después de realizar la investigación bibliográfica, no se encontraron estudios en los cuales la metodología QUECHERS haya sido utilizado en matrices acuosas. Fueron revisados los trabajos realizados por Gratz (2010) y Pule (2012) estudios en los cuales se realiza el análisis de HAPs en mariscos y suelos. Con el fin de evaluar la factibilidad de implementación de este método y debido a la ausencia de material bibliográfico se realizó una verificación práctica.

El desarrollo práctico, el diseño experimental, la obtención y optimización de los parámetros instrumentales, el establecimiento de las condiciones para la extracción de 15 HAPs fluoróforos basada en la técnica SALLE en muestras de agua y el análisis estadístico completo se realizaron desde noviembre del 2015 hasta junio del 2016 en las instalaciones, con el equipamiento y con la colaboración del personal del Departamento Ambiental del Laboratorio Guijarro LASA de Quito.

Se definieron como analitos de interés los siguientes compuestos: naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benz(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo[a]pireno , dibenz(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno, indeno(1,2,3-cd)pireno y las matrices a evaluar, agua de consumo, agua natural y agua residual.

#### 1.3.1 LIMPIEZA DEL MATERIAL

Se aplicaron los mismos criterios de manejo de material y limpieza que los recomendados en el método Standard Methods 6440 y EPA 8310 estos son:

Utilizar reactivos de alta pureza con grado HPLC o superior. Las interferencias más significativas tienen que ver con el material de vidrio limpio. Se debe limpiar todo el material tan pronto como sea posible después de su uso

aclarándose con el último disolvente usado en él, seguido de una limpieza con detergente en agua y un aclarado en etapas con agua del grifo y agua desionizada, secar el material de vidrio en una estufa de 15 a 30 minutos.

Un método para eliminar posibles contaminaciones en material resistente al calor y reactivos sólidos es colocar estos materiales en la mufla por sobre los 400°C por al menos 15 a 30 min (APHA, 2012). El material volumétrico no debe ser calentado. Otra opción para eliminar interferencias térmicamente estables y que no son eliminados con el tratamiento térmico, como el caso de los PCBs policlorobifenilos o bifenilos policlorados, es realizar enjuagues con acetona o hexano grado pesticida. Después de secar y enfriar el material ciérrese y almacene en un entorno limpio para protegerlo de polvo y otros contaminantes. Todo el material de vidrio debe enjuagarse con acetonitrilo previo al uso.

### 1.3.2 CONDICIONES INSTRUMENTALES

Para la obtención de la separación cromatográfica de los 15 HAP se emplearon como base las condiciones instrumentales de Henderson (2008) donde se logra la resolución de los picos en 6 minutos con la misma columna disponible en laboratorio. Sin embargo, el flujo de 2ml/min causa una elevada presión de retorno que puede exceder la presión máxima del cartucho guarda columna, por lo cual se decidió reducir el flujo a 1ml/min. De este modo la separación de todos los picos se logra a menos de 12 min, el tiempo de corrida tuvo que ser corregido también para permitir la elución de compuestos que pueden eluir después de los analitos y se colocó también un tiempo de postrun para equilibrar la columna hasta la próxima inyección. En la **Tabla 14** se muestran las condiciones cromatográficas de separación, la **Figura 9** y **10** muestran cromatogramas obtenidos mediante las condiciones detalladas. La coelución de 4 picos formada por el 1 y 2 metil-naftaleno, acenafteno y fluoreno, no presentó problemas para la identificación y cuantificación, la resolución fue suficiente para que el integrador pueda considerar los picos independientemente incluso en concentraciones diferentes de cada pico como se obtuvo en la muestra de MRC Asequality; en la se puede ver un cromatograma de este material.

La determinación de la identidad de cada pico, al no disponer de estándares individuales, se realizó mediante inyección de mix de varios estándares de concentraciones diferentes, con números de compuestos diferentes y contrastando la información obtenida con el orden de elución bibliográfico para la columna y gradiente de fase móvil usada (Henderson, 2008).

Con relación a la detección, con el fin de tener la máxima sensibilidad del equipo en todos los picos y partiendo del precepto que en equipos diferentes y con software distinto, se pueden obtener resultados notablemente distintos en las longitudes de onda de emisión y excitación (Agilent, 2012), y al no disponer de un detector DAD o estándares individuales para cada compuesto y así optimizar las longitudes de onda mediante un espectrofotómetro UV-Vis y el FLD. Se decidió hacer una optimización mediante información bibliográfica y empleando las herramientas como elución controlada de los picos al detector, detección multicanal y la obtención de espectros con el FLD. De esta forma se pudieron determinar y confirmar las longitudes de onda. Este trabajo fue largo, sin embargo, el uso de las herramientas del equipo ya descritas, ayudó a agilizar el proceso y se vieron notables cambios en la sensibilidad del equipo comparado a las señales obtenidas con las longitudes de los datos bibliográficos una vez terminada la optimización. En la **Tabla 15** se observan las longitudes de onda seleccionadas para cada pico y los tiempos de retención. Y en la **Figura 11** se observa uno de los espectros de fluorescencia obtenidos en la optimización. El ajuste de la ganancia PMT (factor de ajuste de sensibilidad del detector) se configuró en base a las soluciones más bajas y se determinó que era factible el uso del factor 18 a la máxima ganancia sin aumentar el nivel de ruido significativamente.

En el software con fines de simplificar la cita de los nombres y tener una correspondencia más fácil de su identidad para cada uno de los compuestos de interés. Se los ha numerado del 1 al 16 ver **Tabla 15** ordenados por elución, omitiendo el número 2 que queda reservado al Acenaftileno que no es fluorescente, el 17 y 18 se usan para 1 y 2 metil-naftaleno compuestos presentes en un estándar pero que no se los clasificó como analitos de interés. Finalmente,

el 10,5 se lo reserva para el benzo[e]pireno que no está presente en los estándares sin embargo se lo usa como subrogado en algunos métodos EPA. Se deja la posición para futuras oportunidades de mejora del ensayo. Toda la información relacionada con materiales, reactivos, equipos, patrones, material de referencia y metodología usada para esta verificación puede ser revisada en los anexos 4, 5,6 y 7.

### **1.3.3 EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES DE EXTRACCIÓN.**

Se propuso como métodos de extracción de referencia los basados en mezclas de agua y acetonitrilo y que usen sales de fácil obtención, de este modo las extracciones de US EPA 8330 y el AOAC 2007.1, se seleccionaron.

Se inició determinando la cantidad de extractante acetonitrilo que se separaba de la masa de agua. Las pruebas se realizaron con agua grado reactivo y acetonitrilo (libre de fortificaciones). El parámetro de medida fue el volumen del extracto, si era mayor al 50% del acetonitrilo adicionado se daba por aceptada.

Para la extracción basada en el EPA 8330, se tomaron las mismas proporciones sugeridas en el método pero transferidas a una la décima parte del original, esto es 77 ml de agua, 25 g de cloruro de sodio y 16,5 ml de acetonitrilo. La disolución del cloruro de sodio fue difícil y llevo alrededor de 10 minutos con agitación magnética. Después del tiempo de reposo de 10 min la cantidad recuperada de acetonitrilo fue menor de 1 ml equivalente al 6,3%. Al estar la solución próxima a saturación, no se intentó mejorar la separación subiendo la cantidad de cloruro de sodio usado. Al tener una recuperación de solvente tan baja, esta extracción fue descartada.

Para la extracción basada en el AOAC 2007.1, la técnica emplea datos por peso y la validación fue realizada exclusivamente en frutas y vegetales. Sin embargo en el acápite de notas hace referencia al uso de blancos de extracción

con 13 ml de agua grado reactivo, la proporción de 0,5 g de sulfato de magnesio anhidro por gramo de muestra trató de respetarse al máximo (AOAC, 2007).

Se definió la cantidad de muestra en 10 ml de agua con 6g de sulfato de magnesio anhidro y con 10 ml de acetonitrilo para evitar sobrepasar la relación 1:1 extracto muestra. También se evaluó una partición con una proporción mayor de agua y menor de acetonitrilo, esto con el fin de conseguir un factor de concentración en el extracto. Por efectos de espacio en los tubos de extracción de 50 ml y para usar volúmenes estándar de muestra y solventes se limitó la cantidad de agua a 25 ml y 5 ml de acetonitrilo. En este caso se usó 12 g de sulfato de magnesio anhidro.

En la extracción 10 ml agua con 10 ml de acetonitrilo (10:10) se obtuvieron alrededor de 9,5 ml de acetonitrilo equivalente a 95% y en la extracción 25 ml agua con 5 ml de acetonitrilo (25:5), se obtuvieron alrededor de 4,5 ml equivalente al 90%, por lo cual ambas extracciones fueron evaluadas. La relación 25:5 se usó en el rango bajo y medio bajo de las fortificaciones. La relación 10:10 se usó para los dos niveles más altos.

En el método de AOAC 2007.1 se usa como solvente de extracción acetonitrilo con ácido acético al 1%, sin embargo, en este estudio no se empleó basado en los resultados obtenidos en el estudio de Pule 2012.

El empleo del acetato de sodio anhidro también se evaluó, se observó que la adición del mismo eleva la recuperación de los analitos entre un 5% al 12% con un promedio del 8%. Sin embargo, el uso del acetato de sodio eleva la señal de la línea base por lo que se perjudica la detección de analitos en bajas concentraciones por esto no se usó en los niveles bajo y medio bajo. Este efecto se trató de eliminar mediante tratamiento térmico en la estufa a 150 °C dada la imposibilidad de someter el acetato a temperaturas mayores por riesgo de descomposición, sin embargo no se logró reducir la señal en la línea base. El lavado con solventes recomendado en el método 551.1(EPA, 1990) no fue evaluado.

De la misma forma se realizaron pruebas con sobres QuEChERS Extract Tubes, AOAC Method (Part.No 5982-5755) de Agilent Technologies. Pero no se utilizaron debido a su elevado costo que bordea los 8 dólares por kit de extracción comparado a los 1,70 dólares del sulfato de magnesio calcinado localmente incluyendo el tubo de extracción considerado también descartable. Además en los extractos obtenidos del kit 5982-5755 de Agilent Technologies se observaron señales importantes en los tiempos de retención del naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno. Este aporte fue variable entre los dos lotes de sobres evaluados. Y en un solo lote se observó señal en el tiempo de retención del dibenzo(a,h)antraceno y benzo(ghi)perileno.

El uso del clean-up por dSPE no se pudo substituir con una variante preparada localmente, debido a la dificultad de conseguir el PSA y C18 en los distribuidores locales. Por lo cual se evaluó con los kits siguientes: Dispersive SPE 15 mL, Fatty samples, AOAC Bond Elut. Sample Prep Solutions (Part.No 5982-5158) de Agilent Technologies y el *QuEChERS* Dispersive kit AOAC ExtraBond Scharlau for fruits and vegetables with fats and waxes (PN:QUDISAOFK2) de Scharlau Science Group.

El efecto del uso del tubo 2 de clean-up por dSPE es beneficioso también para la recuperación de los analitos, observándose un incremento en la recuperación de un 3% al 10% con una media de 7% para los tubos que se extrajeron con acetato de sodio. Y del 11% al 30% con una media del 14% para los analitos extraídos sin acetato de sodio. Para ambos casos al igual que en el kit de extracción se obtuvieron señales en los tiempos de retención del naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno. Sin embargo, la señal del tubo Agilent fue un poco menor y su efecto en la muestra disminuye cuando se realizan diluciones del extracto.

Debido a estas consideraciones y en detrimento de la recuperación de algunos analitos, y en base a los estudios de (Gratz, et al., 2010) la fase de clean-up se eliminó para las muestras limpias, esto es, matrices de agua natural y de consumo. Para las matrices de agua residual se lo empleo a fin de evitar en cierta forma el ingreso de contaminantes a la columna y el sistema de HPLC. Sin

embargo, no se realizaron pruebas de la efectividad del efecto de clean-up obtenido.

En la **Tabla 21** se muestran el porcentaje de recuperación obtenidos y el efecto que producen el acetato de sodio y el uso del dSPE como variantes de la extracción SALLE probados para una muestra fortificada con HAPs. En este caso se empleó la relación, muestra / acetonitrilo de 25:5.

#### **1.3.4 PROCESAMIENTO DE LOS CROMATOGRAMAS.**

El efecto de la gradiente de solventes y los múltiples cambios de longitud de onda hacen que la línea base del cromatograma normalmente tenga una rampa hacia arriba, este fenómeno también fue descrito por (Gratz, et al., 2010). Este efecto se agrava con las señales aportadas por las matrices y reactivos usados en la extracción, como los tubos de dSPE. Para minimizar la distorsión de la línea base y para reducir su influencia en la integración y los resultados se realizó la sustracción instrumental de la señal de los blancos de muestra. Similar al usado en (Gratz, et al., 2010). Esta es una herramienta que se utiliza normalmente en métodos como el EPA 8015 donde el sangrado de la columna puede comprometer la integración de los picos o bandas como para el caso de los TPHs.

Los blancos de muestra se realizan con agua grado reactivo y siguen todo el proceso de extracción similar a las muestras en cualquiera de las 2 variantes de extracción (25:5 o 10:10). Incluso se deben preparar con las mismas diluciones. Para cada tipo de matriz se corrió en paralelo un blanco con estas características que luego se usó para sustraer su señal de la muestra.

La integración del cromatograma sustraído se realiza de la misma manera que un cromatograma normal. Casi exclusivamente todos los cromatogramas se integraron automáticamente mediante el software y pocos requerían ajustes manuales de integración.

### 1.3.5 TRATAMIENTO DE RESULTADOS.

El contenido de cada uno de los componentes de los 15 compuestos HAPs en ug/L se calculó mediante la ecuación 1:

$$\text{HAPS ( cada compuesto )} = (\text{Area del pico}) \times \text{FD} \times \text{VE (ml)} / (\text{FR} \times \text{Vol.muestra (ml)})$$

Ecuación 1 Cálculo de concentración de los analitos.

- A = Área total del pico corregida la señal del blanco.
- FD = Factor de dilución o concentración
- FR = Factor de Respuesta del Equipo (Pendiente en ug/L / Área)
- VE = Volumen de solvente de extracción usado en el tubo 1 (ml)

### 1.3.6 METODOLOGÍA ESTADÍSTICA.

Una vez determinadas las condiciones instrumentales de operación que permitan establecer la función respuesta del equipo, la cuantificación de los analitos y optimizadas las fases de extracción. Se evaluó la idoneidad del método a través de la participación en una ronda interlaboratorio. En el **Anexo 3** se puede ver el cumplimiento de esta verificación. Seguidamente se procedió a determinar los parámetros de validación en base al diseño experimental siguiente:

#### **Respuesta instrumental:**

Obtención de la función respuesta instrumental del método, a partir de los 6 estándares de calibración, para los 15 compuestos. Cada día se realizaron 3 repeticiones durante 3 días.

Se verificó la exactitud de esta calibración con los 6 estándares de verificación de la curva para los 15 compuestos. Cada día se realizaron 3 repeticiones durante 3 días.

**Material de referencia:**

Se verificó exactitud y precisión de la técnica de extracción con los 4 niveles de fortificación para los 15 compuestos, en cada día se realizó una extracción correspondiente a un blanco de matriz y se realizan tres extracciones por cada nivel de fortificación para cada una de las 3 matrices. Este diseño se repite en tres días distintos en condiciones de reproducibilidad. A cada extracción se le realiza una lectura, las repeticiones son extracciones diferentes.

A partir de los datos anteriores se procedió a calcular la incertidumbre asociada al método para cada nivel de fortificación. Para esto se consideraron las siguientes fuentes de error: exactitud, linealidad, patrones, Anova de Calibración, Anova de método como repetibilidad y reproducibilidad, en cada sección se consideró todo el material volumétrico utilizado, y otras fuentes asociadas. Los datos fueron procesados en Microsoft Excel en hojas de cálculo validadas para cálculo de incertidumbre.

**1.3.7 CALIBRACIÓN Y VERIFICACIÓN**

Para la calibración y la verificación se establecieron los siguientes criterios para declarar como válida la información obtenida:

El coeficiente de variación (CV) de las áreas de las diferentes repeticiones de los estándares preparados en todo el rango de calibración por cada analito y por nivel debe estar dentro del 15% CV que es una especificación similar a la encontrada en (Standard Methods, 6440B, 2012) y más rigurosa comparada a la sugerida en (US EPA 8000, 2014) en donde se acepta hasta un RSD 20%. En las **Figuras 12 a 26** se pueden observar las curvas de calibración para cada uno de los 15 compuestos analizados, además del promedio de las áreas obtenidas para cada nivel de los estándares V, W, X, Y, Z, AA. Y los coeficientes de variación asociados a cada valor. Este CV y la media se calcularon a partir de los 9 datos obtenidos para cada nivel. Los estándares que entraron en la especificación, se graficaron y se usaron para el cálculo de regresión lineal para cada compuesto. Se usó el método de mínimos cuadrados para obtener el factor respuesta.

En las **Tablas 22 a 36** en la primera sección se pueden encontrar los valores obtenidos de las pendientes (m), el intercepto a concentración cero (b), y la precisión asociada a cada valor. Como se explicó en la sección de procesamiento de cromatogramas, la línea base tiene una deriva causada por el gradiente y los múltiples cambios de longitud de onda. La influencia de este fenómeno se desestimó para los estándares por lo cual la integración se realizó de manera directa en los cromatogramas primarios. En el caso de los blancos de acetonitrilo en los cuales el software lograba integrar áreas, estas se emplearon para corregir las áreas de los estándares. En ambas variantes de tratamiento de los resultados las pendientes fueron idénticas o numéricamente muy similares con máximo 3,2% de diferencia para el caso del Indeno(1,2,3-cd)pireno. En el reporte final se decidió usar las áreas corregidas con el blanco. En la **Figura 8** se puede ver la integración de un estándar sin corrección de la línea base.

La curva de calibración elaborada debe tener un FR (m o pendiente) que se encuentre dentro del  $\pm 20\%$ , de la obtenida a partir de las lecturas de los estándares de verificación de la Curva de Calibración. Los estándares de verificación deben provenir de un origen diferente, este estándar fue adoptado en base a (US EPA 8000,2014).

El estándar de verificación de la curva M-PAH5504A99-5ML y la madre asociada a este Std 0 es un estándar que fue preparado en abril del 2015 y con fecha de caducidad de 31 de diciembre del 2015. Se trata de un estándar adquirido en 2013 por el laboratorio pero que no usó previamente. La función principal que se le dio a este estándar fue ayudar a la identificación de los picos en la fase de desarrollo y previo a descartarlo como referencia por caducidad se lo empleó como verificación de la curva en noviembre del 2015. Casi 7 meses después de preparado y a un mes de caducar. Por esta razón la información que se obtuvo de este estándar se la consideró de menor valor analítico, sin embargo la curva elaborada con este estándar cumplió la especificación del 20% establecida en el (US EPA 8000,2014).

Esta especificación de la EPA tiene una contraparte en el (Standard Methods 6440B, 2012) donde el límite que se establece para la diferencia del factor respuesta del equipo es de 15%. Esta especificación no se cumplió a

cabalidad ya que el antraceno dio un error del 15,7% el resto de pendientes dieron errores no mayores a 7,4%. Se cree que este desvío puede deberse a la antigüedad de esta solución y su proximidad a la caducidad. Sin embargo, al entrar en la especificación (US EPA 8000, 2014). Se dio por aceptada la calibración. En la **Tabla 37** se encuentra la comparación entre la curva de calibración y la verificación. Establecida la curva de calibración se definió el estándar, y como control con un rango de aceptación al 20% similar al valor establecido por la (US EPA 8000,2014).

### 1.3.8 PRUEBAS DE RECUPERACIÓN Y DATOS DE VALIDACIÓN

En las **Tablas 22 a 36** se pueden observar las pruebas de recuperación en los cuatro niveles de concentración propuestos, en las **Tablas 38 y 39** se resumen estos resultados. El porcentaje presentado es el promedio de las 9 repeticiones realizadas por compuesto y por nivel según el plan estadístico planteado. Hay que especificar el origen de estos cuatro niveles para interpretar lo resultados obtenidos. Los niveles bajo, medio bajo y alto, provinieron de la fortificación de las matrices. Para estas muestras no caracterizadas por alguna fuente de certificación, se les asignó la concentración teórica resultante de la adición de los estándares SK1 o SK2. Significa que en estas muestras el valor real y valor certificado son el mismo. Esto en la práctica no ocurre en la certificación de materiales y pruebas de interlaboratorio, el valor certificado es el promedio de resultados obtenidos por varias fuentes o técnicas o laboratorios y este es un valor que comúnmente es menor al valor real.

El valor real, es el valor de la fortificación o la cantidad primaria de sustancia en peso u otra referencia cuantificable con la que se fortificó un material. En algunas técnicas como en el análisis de metales ambos valores son muy similares o iguales, porque la digestión disuelve el material y la lectura se hace sobre el líquido resultante. Entonces en estas técnicas es común recuperaciones del 90% o superior. Pero para el caso de las extracciones de compuestos orgánicos la partición causada por la extracción con solventes logra asintóticamente transferir una fracción por vez de los analitos, lo que hace muy

difícil alcanzar recuperaciones próximas al 100% por lo menos en un número razonable de extracciones. El mismo origen por medio del cual se certificó el valor de un material no está exento de este error. De hecho, como se muestra en la **Tabla 10** de exactitud de Standard Methods o la **Tabla 11** de FoPT del TNI-Nelac. En las técnicas de HAPs es normal tener recuperaciones alrededor del 70 y 80 % y hasta menores. Aclarada esta observación, de manera general se obtuvieron recuperaciones entre el 61 al 114% valores muy aceptables a la vista de las **Tablas 9, 10 y 11**.

Para el caso del MRC de Asequality, en el nivel medio alto, la mayor recuperación se obtuvo en el naftaleno con un 114%, confirmando lo descrito en la bibliografía que esta técnica presenta mayor recuperación que las técnicas tradicionales en los compuestos más volátiles. La ventaja de realizar la extracción en un envase cerrado y la omisión de la concentración y cambio de solventes pueden ser las causas. Efecto contrario al observado en los compuestos de pesos molecular mayor como es el caso del dibenzo(a,h)antraceno, y benzo(ghi)perileno, sugestivamente, la alta polaridad del acetonitrilo podría ser una de las causas.

Con relación a los materiales fortificados, en casi todos los compuestos analizados se observa una reducción de la recuperación mientras la concentración aumenta, esto se le atribuye al aporte en el volumen total de acetonitrilo causado por la fortificación, este volumen extra de acetonitrilo no fue considerado en el volumen de extracción total. En el rango más alto es de 417 ul equivalente a un 4,2% y en este grupo es donde se presentó la menor recuperación para el caso del Indeno(1,2,3-cd)pireno con el 61%. En el nivel bajo y medio bajo la cantidad de solvente aportado es de 93,4 ul y 333 ul respectivamente. Esto se traduce en una dilución del extracto de 1,9% para el rango bajo y 6,7% para el rango medio bajo. En la tabla 38 se pueden ver las recuperaciones obtenidas comparándolas con la recuperación esperada en los NELAC, 2016

Si se considera este volumen adicional y se corrigen los porcentajes de recuperación los valores suben y se comienzan a acercarse entre sí. Pero se conserva la misma tendencia a ser menor la recuperación a concentraciones más altas, no se encontró una posible causa para este fenómeno, se descarta saturación ya que los HAPs son muy solubles en acetonitrilo y los estándares incluso tienen concentraciones mayores (sin sulfato de magnesio) y solo pueden exhibir ese comportamiento a bajas temperaturas, condiciones que no se dieron en este caso.

Con relación a la incertidumbre se observa un comportamiento muy similar en todos los compuestos, y en los diferentes niveles. Globalmente la incertidumbre media está en el 13,5% con una incertidumbre máxima de 23,1% que corresponde al Acenafteno del MRC de Asequality. Este incremento está causado por el nivel de lectura en la curva ya que este compuesto es el más pequeño en este material de referencia. Ver **Figura 10**. En el **Anexo 3** se puede verificar la incertidumbre asociada al valor certificado del MRC de Asequality, en la **Tabla 39** se observa la comparación de la desviación estándar del ensayo interlaboratorio comparado con los datos de incertidumbre obtenidos en la verificación práctica.

La distribución en función a la concentración es muy homogénea y los valores son muy cercanos, esto se debe producir porque al momento de realizar las diluciones a partir de los extractos de las muestras fortificadas, se ajustó la concentración final para entrar en un rango estrecho de la curva entre 3 estándares donde todos los picos están en el rango de calibración para no realizar varias diluciones e inyecciones para un mismo nivel de concentración. De esta manera la influencia de la incertidumbre debida de la curva se minimizó.

Sin embargo, las muestras al sufrir un proceso de extracción en concentraciones distintas desde la matriz, al mantener relaciones diferentes de muestra y solvente y al estar sujetas a dilución, que son factores que también aportan a la dispersión de los datos, esos aportes también son moderados ya la homogeneidad de las incertidumbres se mantiene, lo que indica que se guarda homogeneidad en el procesamiento de las muestras. Adicionalmente este punto

no aplicaría para el MRC Asequality ya que este tiene un origen distinto y concentraciones de los compuestos diferentes a las fortificaciones y pese a esto la homogeneidad se mantiene, en todos los casos a excepción del acenafteno que ya se discutió.

En general el desempeño del método siguió las directrices impuestas en los métodos de referencia y consiguió recuperaciones de los analitos en niveles bajos comparables a los esperados en las técnicas tradicionales de extracción y además con una incertidumbre moderada. Habiendo cumplido las expectativas del laboratorio para el requerimiento analítico y en los rangos de concentración útiles para las muestras de mayor frecuencia en el laboratorio, el método se lo declaró validado en junio del 2016.

## 2 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En los diversos artículos estudiados se observa una buena correspondencia de la SALLE para la extracción de HAPs en muestras de alimentos y suelos. Y puede ser una opción viable para la sustitución del diclorometano como solvente de extracción

Al no existir información de trabajos similares realizados en matrices acuosas, no se puede comparar los datos obtenidos en la verificación práctica realizada en el Laboratorio Guijarro LASA. Sin embargo los datos de

Comparando la extracción tradicional realizada con diclorometano u otros solventes no polares con la extracción SALLE, para la determinación de HAPs en aguas por HPLC, esta presenta algunas ventajas y desventajas.

### **Ventajas**

Requiere instrumental de laboratorio común, recipientes cerrados, vortex y centrífuga, no se requiere de instrumentación avanzada, sistemas de destilación o espacios amplios ni permanentes para el desarrollo de la extracción. Lo que hace que sea de sencilla implementación en el laboratorio y no requiere fuertes inversiones.

No requiere grandes cantidades de muestra. Permite reducir la cantidad de botellas que llegan al laboratorio por muestra, lo que descongestiona los sitios de

almacenamiento de muestras como estantes y refrigeradores. Reduce el costo de logística y facilita el trabajo al personal de muestreo y reduce costos de envío.

No requiere volúmenes altos de solvente. Por muestra se requiere entre 5 y 10 ml de acetonitrilo, esto reduce el costo asociado al solvente en la extracción, facilita el proceso de las muestras a los analistas y reduce el riesgo de accidentes al manipular volúmenes grandes de solvente.

No es necesario un procedimiento de cambio de solvente ya que el extracto ya está en acetonitrilo y se puede inyectar directamente en el HPLC. Esto reduce el tiempo dedicado a este procedimiento y mejora la recuperación de analitos volátiles como el Naftaleno

El procedimiento es simple y rápido. Permite la extracción en pocos minutos y de varias muestras de manera simultánea lo que reduce costos de mano de obra y aumenta la capacidad de procesamiento del laboratorio. En los ensayos realizados se comprobó que un solo analista puede procesar en menos de una hora hasta 8 muestras, con dos analistas hasta 16 los cuellos de botella son la disponibilidad de sorbonas y la capacidad máxima de la centrífuga.

El acetonitrilo es un compuesto menos peligroso y tóxico que el diclorometano y poco volátil por lo que es difícil alcanzar grandes concentraciones en el ambiente. El riesgo asociado al solvente se reduce fuertemente, no se pretende decir que el acetonitrilo no es peligroso, sino que su toxicidad es menor y hasta la fecha ninguna agencia de seguridad lo ha catalogado como cancerígeno.

Es una extracción en pequeña escala y usa materiales de bajo costo, permite trabajar con material desechable lo que reduce el riesgo de errores en los resultados causado por contaminación cruzada o por carry over. Adicionalmente se elimina el riesgo para el analista y el personal encargado del lavado de materiales por la manipulación de los residuos de muestras analizadas sean contaminadas o fortificaciones de control de calidad.

Al ser el acetonitrilo un compuesto más polar que el diclorometano (momento dipolar de 3.92 D vs 1.6 D del diclorometano) disuelve un rango más amplio de sustancias con polaridad media a alta por lo que mejora la recuperación de un rango amplio de analitos por lo que se podría usar en el desarrollo de otros métodos.

### **Desventajas**

La SALLE al usar bajas cantidades de muestra y solvente no permite con facilidad usar técnicas de concentración para alcanzar límites bajos por lo que el equipo de medida debe ser más sensible que para las técnicas tradicionales.

Por la polaridad del acetonitrilo además de los analitos de interés se pueden extraer otras sustancias diferentes a las que se extrae con diclorometano. Por lo que sí están presentes interferentes en la matriz estos podrían ser extraídos en mayores cantidades junto con los analitos. Esto exige que la técnica instrumental deba ser muy selectiva y robusta para discriminar la señal de la matriz versus los analitos.

La extracción SALLE al producir pequeñas cantidades de extracto no permite usar técnicas de clean up tradicionales sin la necesidad de entrar en procedimientos de cambio de solvente y fases de concentración. De modo casi exclusivo estos pasos solo se evitan con el uso del clean-up por dSPE el cual no tiene una efectividad tan alta como otros métodos.

La cantidad de sal utilizada es grande con relación a la cantidad de muestra. Por lo que el precio de este insumo impacta directa y de manera importante en el costo del análisis y además limita la posibilidad de emplear cantidades mayores de muestra con fines de concentrar los extractos para mejorar límites de cuantificación. Adicionalmente los desechos requieren gestión ambiental por su elevada salinidad y por contener residuos de acetonitrilo.

A pesar de estas desventajas, opino que se observan en la técnica de extracción SALLE numerosos beneficios en el ahorro de solventes, reducción de

los riesgos, ahorro de tiempo, facilidad en la extracción y la gran aplicabilidad que se ha visto de esta técnica para HAPs y otros analitos en matrices más complejas.

### **Recomendaciones:**

Como se pudo ver en la selección de los niveles de calibración y en la organización de los niveles de concentración probados en las matrices, el hecho de tener todos los compuestos previamente mezclados en las soluciones mix, tuvo un fuerte impacto en el desarrollo del estudio por las limitaciones que causó en la calibración.

A mi criterio ninguna de las combinaciones de estándares recomendadas en el EPA 8310 o 550 se ajustan fácilmente a trabajo en HPLC con FLD, ya que las concentraciones de los primeros picos son excesivamente elevadas con relación a los demás picos, esto puede ser útil en la configuración HPLC UV-FLD por su baja sensibilidad. Por las diferencias en las pendientes obtenidas entre los 15 picos, muy seguramente los estándares con concentraciones iguales tampoco serían los más acertados. Además, por lo general estos estándares al ser para GC vienen en solventes incompatibles para fase reversa.

Se debe ser muy escrupuloso en la selección de los materiales de trabajo, durante el desarrollo, el cambio de viales, filtros, jeringas, solventes, y la misma variabilidad en los insumos dentro del mismo proveedor pueden dar lugar a picos fantasmas debido a altísima sensibilidad en la que se configuró el detector. Algunos de estos problemas se solucionaron con la técnica de blancos y la sustracción de señal, sin embargo, siempre es más valioso tener el cromatograma libre de estos problemas.

Como en todas las técnicas de HPLC, se debe mantener un registro de la variación de presión en la columna a lo largo de su vida útil, eventualmente esto afecta los tiempos de retención de los picos en pocos segundos. Esto puede no ser notorio en las ventanas de integración, pero sí tiene efecto sobre los tiempos de cambio de longitud de onda programados en el detector. Si no se actualizan

estos tiempos con la suficiente frecuencia se pueden experimentar leves derivas en el comportamiento de la función respuesta que pueden perjudicar la cuantificación.

Una de las mayores fuentes de error se debe a los pasos previos al análisis o preparación de la muestra. Se recomienda que el personal que efectúe este proceso, esté muy familiarizado con la técnica y se debe permitir el desarrollo de mayor destreza a través de la práctica guiada por un analista que tenga mayor conocimiento del método.

Como se explicó en la sección de interferencias un factor que debe ser tomado en cuenta es la limpieza del material que se va a emplear en el análisis, ya que inclusive el material de vidrio puede retener restos lo suficientemente importantes para registrarse por el equipo. La limpieza del material se debe realizar según se lo expone y el material no debe ser empleado para otros análisis (material dedicado). Incluso la compartición de pipetas automáticas con puntas desechables suele conllevar a problemas en todos los tipos de cromatografía instrumental.

## BIBLIOGRAFÍA

Agilent Technologies, Inc., (2014) *Agilent Bond Elut QuEChERS extraction kit A collection of citations to advance your research*, Agilent Technologies 5991-3065EN, Recuperado de: <http://www.agilent.com/cs/library/Citations/Agilent%20QuEChERS%20ext%20kit.pdf>

Agilent Technologies (2012), *1260 Infinity Fluorescence Detector (G1321B) - User Manual*, G1321-90012 Rev. C 13-Nov-2012 Recuperado de: [http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G1321-90012\\_FLD\\_USR\\_RevC\\_ENU.pdf](http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G1321-90012_FLD_USR_RevC_ENU.pdf)

AOAC International, (2007), *AOAC Official Method 2007.01 Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate Gas Chromatography / Mass Spectrometry and Liquid Chromatography / Tandem Mass Spectrometry* Recuperado de: [https://nucleus.iaea.org/fcris/methods/MRM\\_AOAC\\_2007\\_01.pdf](https://nucleus.iaea.org/fcris/methods/MRM_AOAC_2007_01.pdf)

Avantor (2015), Ficha de datos de seguridad Diclorometano, Número de versión 129, Recuperado de: [http://www.avantormaterials.com/Documents/MSDS/DEV/E/MSDS\\_9315-212\\_ES.PDF](http://www.avantormaterials.com/Documents/MSDS/DEV/E/MSDS_9315-212_ES.PDF)

Baird, C., Cann, M., (2012). *Química Ambiental*. pp 663-672. 2da edición. Barcelona España: Editorial Reverté S.A. ISBN: 978-84-291-7915-6

Bio-equip, 2016, Figura equipo concentrador evaporador de nitrigeno, Recuperado de: <http://www.bio-equip.cn/eWebEditor/UploadFile/34715.jpg>

Carrasco, D., (2007). *Aislamiento e Identificación de Bacterias con Capacidad Degradadora de Hidrocarburos, Comprobando su Actividad Enzimática*. (Disertación de pregrado). Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador.

Comité Européen de Normalisation CEN (2008) *BS EN 15662:2008 Foods of Plant origin - Determination of Pesticide Residues Using GC-MS and/or LC-MS/MS following Acetonitrile Extraction/Partitioning and Clean-up by Dispersive SPE QuEChERS-Method.* Recuperado de [http://www.chromnet.net/Taiwan/QuEChERS\\_Dispersive\\_SPE/QuEChERS\\_%E6%AD%90%E7%9B%9F%E6%96%B9%E6%B3%95\\_EN156622008\\_E.pdf](http://www.chromnet.net/Taiwan/QuEChERS_Dispersive_SPE/QuEChERS_%E6%AD%90%E7%9B%9F%E6%96%B9%E6%B3%95_EN156622008_E.pdf)

Cromlab, 2016, Figura manifold y cartuchos del sistema SPE, Recuperado de: <http://blog.cromlab.es/wp-content/uploads/VM.jpg>

Cuesta, I., (2016). *Determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en Aguas y Sedimentos de Ríos de la Amazonía Ecuatoriana.* (Tesis de Maestría). Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador.

De Gisi, S., Lofrano, G., Grassi, M., Notarnicola, M., (2016). *An Overview of Low-Cost Adsorbents for Wastewater Treatment, Sustainable Materials and Technologies*, pp.1. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214993715300221> doi: 10.1016/j.susmat.2016.06.002

Department of Health & Human Services USA. Centers for Disease Control and Prevention, CDC (2013) *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)* Recuperado de: [https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-03/documents/pahs\\_factsheet\\_cdc\\_2013.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-03/documents/pahs_factsheet_cdc_2013.pdf)

Department of Health & Human Services USA. Agency for Toxic Substances and Disease Registry ATSDR. (1996). *Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons [PAHs])*. Recuperado de <http://www.cvs.saude.sp.gov.br/pdf/toxfaq120.pdf>

Department of Health & Human Services USA. Agency for Toxic Substances and Disease Registry ATSDR. (1995). *Public Health Statement Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*. Recuperado de <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp69-c1-b.pdf>

Department of Health & Human Services USA. Agency for Toxic Substances and Disease Registry ATSDR. (1996). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) ToxFAQs* Recuperado de <https://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tfacts69.pdf>

Department of Health & Human Services USA. Agency for Toxic Substances and Disease Registry ATSDR. (2009). *Case Studies in Environmental Medicine Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*. Recuperado de <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/pah/docs/pah.pdf>

Diario Oficial de las Comunidades Europeas (1998). *Directiva 98/83/CE del Consejo de 3 de Noviembre de 1998. Relativa a la Calidad de las Aguas Destinadas al Consumo Humano* Recuperado de <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:31998L0083&from=EN>

Digambara Patra.(2003). *Applications and New Developments in Fluorescence Spectroscopic Techniques for the Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Recuperado de [http://rgmlab.chem.uconn.edu/teaching/chem-337/Student\\_talks/Zhang\\_PAH](http://rgmlab.chem.uconn.edu/teaching/chem-337/Student_talks/Zhang_PAH) DOI: 10.1081/ASR-120021166

Drinking Water Inspectorate (2010) *What are The Drinking Water Standards?* Recuperado de <http://dwi.defra.gov.uk/consumers/advice-leaflets/standards.pdf>

Drinking Water Inspectorate No. 614. *Water, England and Wales. The Water Supply (Water Quality) Regulations 2016*. (2016) Recuperado de [http://www.legislation.gov.uk/uksi/2016/614/pdfs/uksi\\_20160614\\_en.pdf](http://www.legislation.gov.uk/uksi/2016/614/pdfs/uksi_20160614_en.pdf)

Drinking Water Inspectorate GUIDANCE ON THE IMPLEMENTATION OF THE WATER SUPPLY (WATER QUALITY) REGULATIONS 2000 REGULATIONS 2000 (as amended) IN ENGLAND (2012) Recuperado de [http://dwi.defra.gov.uk/stakeholders/guidance-and-codes-of-practice/WS\(WQ\)-regs-england2010.pdf](http://dwi.defra.gov.uk/stakeholders/guidance-and-codes-of-practice/WS(WQ)-regs-england2010.pdf)

Drinking Water Inspectorate GUIDANCE ON THE IMPLEMENTATION OF THE WATER SUPPLY (WATER QUALITY) REGULATIONS 2010 IN WALES (2010) Recuperado de [http://www.dwi.gov.uk/stakeholders/guidance-and-codes-of-practice/WS\(WQ\)%20Regulations%20Wales2010.pdf](http://www.dwi.gov.uk/stakeholders/guidance-and-codes-of-practice/WS(WQ)%20Regulations%20Wales2010.pdf)

Environmental Protection Agency, *EPA Method 610(1984): Polynuclear Aromatic Hydrocarbons*. Recuperado de: [https://www.nemi.gov/methods/method\\_summary/4713/](https://www.nemi.gov/methods/method_summary/4713/)

Environmental Protection Agency, *Method 1625(1984).: Base/Neutrals and Acids.*  
Recuperado de: [https://www.nemi.gov/methods/method\\_summary/4686/](https://www.nemi.gov/methods/method_summary/4686/)

Environmental Protection Agency, *Method 8310(1986) Polynuclear Aromatic Hydrocarbons.*  
Recuperado de <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/8310.pdf>

Environmental Protection Agency, *Method 8100(1986) Polynuclear Aromatic Hydrocarbons..*Recuperado de <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/8100.pdf>

Environmental Protection Agency, *Method 550(1990)Determination Of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons InDrinking Water By Liquid-Liquid Extraction And HPLC WithCoupled Ultraviolet And Fluorescence Detection..* Recuperado de [https://www.nemi.gov/methods/method\\_pdf/4782/](https://www.nemi.gov/methods/method_pdf/4782/)

Environmental Protection Agency, (1993)*Provisional Guidance for Quantitative Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons,* Recuperado de: [http://ofmpub.epa.gov/eims/eimscomm.getfile?p\\_download\\_id=466885](http://ofmpub.epa.gov/eims/eimscomm.getfile?p_download_id=466885)

Environmental Protection Agency.(1993).., *Phenanthrene Factsheet*Recuperado de: <https://archive.epa.gov/epawaste/hazard/wastemin/web/pdf/phenanth.pdf>

Environmental Protection Agency, *Method 525.2, Revision 2.0(1995): Determination of Organic Compounds in Drinking Water by Liquid-Solid Extraction and Capillary Column Gas Chromatography/Mass Spectrometry..* Recuperado de [https://www.nemi.gov/methods/method\\_summary/4804/](https://www.nemi.gov/methods/method_summary/4804/)

Environmental Protection Agency Method U.S. EPA-OGWDW/TSC: 551.1 (1995) *Determination of Chlorinated Disinfection Byproducts, Chlorinated Solvents, and Halogenated Pesticides/Herbicides in Drinking Water by Liquid/Liquid Extraction and Gas Chromatography with Electron Capture Detection* Recuperado de: [https://www.nemi.gov/methods/method\\_summary/4809/](https://www.nemi.gov/methods/method_summary/4809/)

Environmental Protection Agency Method U.S. EPA-Method 4035 (1996): *Soil Screening for Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by Immunoassay* Recuperado de: [https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/4035\\_0.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/4035_0.pdf)

Environmental Protection Agency, *Method 8270D(1998) Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS)*, Recuperado de: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-8270d.pdf>

Environmental Protection Agency (2000), *Methylene Chloride (Dichloromethane) Hazard Summary-Created in April 1992; Revised in January 2000*, Recuperado de: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/methylene-chloride.pdf>

Environmental Protection Agency Method U.S. EPA 8330A/B, (2006 / 2007) *Nitroaromatics, Nitramines, and Nitrate Esters by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*, Recuperado de: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-8330b.pdf>

Environmental Protection Agency, (2010), *Development of a Relative Potency Factor (RPF) Approach for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Mixtures (External Review Draft)* Recuperado de: [https://cfpub.epa.gov/ncea/iris\\_drafts/recordisplay.cfm?deid=194584](https://cfpub.epa.gov/ncea/iris_drafts/recordisplay.cfm?deid=194584)

Environmental Protection Agency Method U.S. EPA Method 8000d (2014) *Determinative Chromatographic Separations*, Recuperado de: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/8000d.pdf>

European Commission Joint Research Centre, Lerda, D, (2011). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Factsheet*. 4th edition Recuperado de [https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/Factsheet%20PAH\\_0.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/Factsheet%20PAH_0.pdf)

Food safety authority of Ireland, (2015), *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Food*, Recuperado de: [https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiLrseGsfTQAhUJ-mMKHUffCOgQFgggMAE&url=https%3A%2F%2Fwww.fsai.ie%2Fworkarea%2Fdownloadasset.aspx%3Fid%3D8416&usg=AFQjCNE6criEbcL\\_C-ybLD5t76wC2xjJaw&sig2=IXfRGUGVrH06RC5k-Y47jA](https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiLrseGsfTQAhUJ-mMKHUffCOgQFgggMAE&url=https%3A%2F%2Fwww.fsai.ie%2Fworkarea%2Fdownloadasset.aspx%3Fid%3D8416&usg=AFQjCNE6criEbcL_C-ybLD5t76wC2xjJaw&sig2=IXfRGUGVrH06RC5k-Y47jA)

Garcia, M., (2005). *Los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos Asociados a Combustibles Fósiles. Caracterización, Análisis y Remediación*. (Tesis de Maestría). Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España Recuperado de [http://oa.upm.es/400/1/MARIA\\_JESUS\\_GARCIA\\_MARTINEZ.pdf](http://oa.upm.es/400/1/MARIA_JESUS_GARCIA_MARTINEZ.pdf)

- Gavilanes, R., (2013). *Determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en Suelos Contaminados por la Industria Petrolera*. (Disertación de pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Gortaire, J., (2015). *Evaluación de Enzima Biodegradadora de HAP`S Obtenida a Partir del Micelio de Hongos Agaricoides*. (Disertación de pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Gratz, S.,Mohrhaus, A.,Gamble, B.,Gracie, J.,Jackson, D.,Roetting, J.,Ciolino, L.,McCauley, H., Schneider, G.,Crockett, D.,Krol, W.,Arsenault, T.,White, J.,Flottmeyer, M.,Johnson, Y., Heitkemper, D.,Fricke, F., (2010). *Screen for the Presence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Select Seafoods Using LC-Fluorescence*. *FDA/ORA/DFS Laboratory Information Bulletin No. 4475*, 1-39. Recuperado de <http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/UCM220209.pdf>
- Hamacher, C., Brito, A., Andrade, I.,Wagener, A., Moreira, I., (2000). *The determination of PAH by UV-Fluorescence Spectroscopy in Water of Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil* pp. 1-3Recuperado de <http://www.scielo.br/pdf/rboce/v48n2/07.pdf>
- Henderson John W., Jr., William Biazzo, and William Long (2008) Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Separations Using ZORBAX Eclipse PAH Columns – Analyses from Six to 24 PAHs Agilent Technologies, Inc. 5989-7968EN Recuperado de [http://www.crawfordscientific.com/downloads/Newsletters\\_pdf/08December/Eclipse\\_PAH\\_2.pdf](http://www.crawfordscientific.com/downloads/Newsletters_pdf/08December/Eclipse_PAH_2.pdf)
- i00.i.aliimg.com, 2016, Figura embudos de separación, Recuperado de: [http://i00.i.aliimg.com/img/pb/886/764/466/466764886\\_104.jpg](http://i00.i.aliimg.com/img/pb/886/764/466/466764886_104.jpg)
- i.ytimg.com, 2016, Figura bomba de vacío y manifold del sistema SPE, Recuperado de: <https://i.ytimg.com/vi/MLGbVbapzn4/maxresdefault.jpg>
- Imlab, 2016, Figura equipo rotavapor sistema axial buchi, Recuperado de: [http://www.imlab.com/buchi/Rotavapor\\_R-215%20ADVANCED.jpg](http://www.imlab.com/buchi/Rotavapor_R-215%20ADVANCED.jpg)
- Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN (2014) *Norma Técnica Ecuatoriana nte inen 1108 Quinta Revisión 2014-01 Agua Potable. Requisitos*, Quito – Ecuador, Recuperado de <http://normaspdf.inen.gob.ec/pdf/nte/1108-5.pdf>

International Agency for Research on Cancer IARC (2016), *List of classifications Carcinogenic Risks to Humans, Volumes 1–117*, Recuperado de [http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/List\\_of\\_Classifications.pdf](http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/List_of_Classifications.pdf)

International Agency for Research on Cancer IARC (1999), *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 71, Francia (1999), pp258* Recuperado de: <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol71/mono71-10.pdf> ISBN 92 832 1271 1

Lehotay Steven J., Ronald E. Majors, Michelangelo Anastassiades (2010) *QuEChERS Revolution*, LCGC Europe Volume 23, Issue 8, pp 418–429, Recuperado de <http://www.chromatographyonline.com/QuEChERS-revolution>

Majors Ronald E. (2009), *Salting-out Liquid-Liquid Extraction (SALLE)*, LCGC North America Volume 27, Issue 7, pp 526–533 Recuperado de: <http://www.chromatographyonline.com/salting-out-liquid-liquid-extraction-salle>

Miller, J.C.(1993), "Estadística para Química Analítica", Capítulo 4, 2da edición, Ed. Adison-Wesly Iberoamericana, Delaware,

Ministry of the Environment Japan, (2016), *III Analytical Methods*, <https://www.env.go.jp/en/chemi/pops/Appendix/04-GuideLine/04Chapter3.pdf>

Municipio del Distrito Metropolitano de Quito. (2014) *Las Normas Técnicas para la Aplicación de la Codificación del Título V, "del Medio Ambiente", Libro Segundo, del Código Municipal para el Distrito Metropolitano de Quito*. Recuperado de: [http://190.11.24.214/PDF\\_Enlaces/Resoluciones/Resol.\\_No.\\_0002-SA-2014\\_20.01.2014.pdf](http://190.11.24.214/PDF_Enlaces/Resoluciones/Resol._No._0002-SA-2014_20.01.2014.pdf)

NASA (2014) *Need to Track Organic Nano-Particles Across the Universe? NASA's Got an App for That*. Recuperado de: <https://www.nasa.gov/ames/need-to-track-organic-nano-particles-across-the-universe-nasas-got-an-app-for-that/>

The National Institute for Occupational Safety and Health (2016), *NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards Methylene chloride*, Recuperado de: <https://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0414.html>

National Oceanic and Atmospheric Administration NOAA (1998), Method 130.30 Sampling and Analytical Methods of the National Status and Trends Program Mussel Watch Project: 1993-1996 Update, Recuperado de: [https://www.nemi.gov/methods/method\\_summary/7175/](https://www.nemi.gov/methods/method_summary/7175/)

Nollet, L., Toldrá, F., (2013). *Food Analysis by HPLC*. pp 827, 1003-1016, 3ra edición. Boca Ratón USA: Taylor & Francis Group. ISBN 978-1-4398-3084-0

Organomation, (2016). Figura equipo kuderna danish automático, Recuperado de: [https://www.organomation.com/sites/default/files/Organomation\\_120613-5873%2012010-C-Square\\_0.jpg](https://www.organomation.com/sites/default/files/Organomation_120613-5873%2012010-C-Square_0.jpg)

Ortiz, R., Cram, S., Sommer, I.,(2011). *Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) En Suelos De La Llanura Aluvial Baja Del Estado De Tabasco, México* pp. 1-2 Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/uc/v28n2/v28n2a3.pdf>

Occupational Safety and Health Administration OSHA and National Institute for Occupational Safety and Health NIOSH (2013), *Methylene Chloride Hazards for Bathtub Refinishers*, Recuperado de: [https://www.osha.gov/dts/hazardalerts/methylene\\_chloride\\_hazard\\_alert.html](https://www.osha.gov/dts/hazardalerts/methylene_chloride_hazard_alert.html)

Occupational Safety and Health Administration, (2012), *Methylene Chloride Exposure Limits and Health Effects*, Recuperado de: [https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH\\_253450.html](https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_253450.html)

Pérez-Morales, G., Morales-Gómez, P., Haza-Duaso, A., (2016). Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) (I): Toxicidad, Exposición de la Población y Alimentos Implicados. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 2016 10 (1), pp 1-7. Recuperado de <https://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/viewFile/51869/48027>

Pfannkoch Edward A., John R. Stuff, Jacqueline A. Whitecavage, Jeffrey H. Moran, *Alternative Procedure for Extraction and Analysis of PAHs in Seafood by QuEChERS-SBSE-GC-MS*, Gerstel, Inc 2010 AN/2010/6a - AN/2010/6b - Recuperado de:

[http://www.grupobiomaster.com/aplicaciones\\_archivo/pgcan201006a\\_.pdf](http://www.grupobiomaster.com/aplicaciones_archivo/pgcan201006a_.pdf)  
 parte a, <http://www.gerstelus.com/media/1036/p-gc-an-2010-06-b.pdf> parte  
 b

Pule Bellah O, Lesego C. Mmualefe, Nelson Torto, (2012) *Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil with Agilent Bond Elut HPLC-FLD*, Agilent Technologies, 5990-5452EN Recuperado de:  
[https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwid1My1puvQAhXI7iYKHcbOCzkQFgg0MAM&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffile.PostFileLoader.html%3Fid%3D57878382dc332d3d915cc069%26assetKey%3DAS%253A383726010814464%25401468498818066&usg=AFQjCNFgA\\_g8Dio5YxTmKpNGt4OkL6al3A&sig2=XCWXoCuxvpoVVI7aWFyd-Q](https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwid1My1puvQAhXI7iYKHcbOCzkQFgg0MAM&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffile.PostFileLoader.html%3Fid%3D57878382dc332d3d915cc069%26assetKey%3DAS%253A383726010814464%25401468498818066&usg=AFQjCNFgA_g8Dio5YxTmKpNGt4OkL6al3A&sig2=XCWXoCuxvpoVVI7aWFyd-Q)

Pule Bellah O, Lesego C. Mmualefe, Nelson Torto, (2012) *Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fish with Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC Kit and HPLC-FLD*, Agilent Technologies, 5990-5441EN Recuperado de:  
<https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-5441EN.pdf>

Ramalhosa, M., Paíga, P., Morais, S., Sousa, A., Gonçalves, M., Delerue, C., Prior, M., (2012) *Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fish: Optimisation and Validation of Microwave-Assisted Extraction*, pp 1-7, Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.078>

RAOHE Ministerio del Ambiente (2010), *Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarburíferas Decreto 1215* Recuperado de  
<https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwisvLf6pvTQAhXE4yYKHbqZBuAQFggaMAA&url=http%3A%2F%2Faolex.fao.org%2Fdocs%2Ftexts%2Fecu79497.doc&usg=AFQjCNGh4rcJWkIFTBjyBzIDI8xot43-Ug&sig2=Wg4cKuYBjaJ0X0Rz8qdnfw>

Secretaria de Salud Laboral y Medio Ambiente MCA- UGT Federación de Industria (2009). *Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP). Acercamiento a su Problemática como Riesgo Laboral*. Recuperado de  
[http://portal.ugt.org/saludlaboral/publicaciones\\_new/files\\_hidrocarburos/bin/der1.pdf](http://portal.ugt.org/saludlaboral/publicaciones_new/files_hidrocarburos/bin/der1.pdf)

Sigma Aldrich, (2016), *The 12 Principles of Green Chemistry*, Recuperado de  
<http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/greener-alternatives/green-chemistry.html>

- Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R. (2008). *Principios de Análisis Instrumental*. (Capítulo 15 pp. 399-411) 6ta edición. México D.F.: Cengage Learning Editores, S.A. de C.V. ISBN-13:978-697-481-390-6.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R. (2015). *Fundamentos de Química Analítica*. (capítulo 27 pp. 760-766, capítulo 31 pp. 852, capítulo 33 pp. 912 y 913) 9na edición. México D.F.: Cengage Learning Editores, S.A. de C.V. ISBN 978-607-519-377-9
- Smith Doris and Ken Lynam (2012), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Analysis in Fish by GC/MS Using Agilent Bond Elut *QuEChERS* dSPE Sample Preparation and a High Efficiency DB-5ms Ultra Inert GC Column Agilent Technologies, Inc. 5990-6668EN, Recuperado de: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-6668EN.pdf>
- Rice-Baird-Eaton-Clesceri, *Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater*, 2012. (Capitulos, Method 6440b y Method 6410B, pp 6/73-6/99), Edición 22, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation ISBN-13: 978-0875530130
- Restek Corporation (2012), Example dSPE Cleanup: PAHs in Infant Formula *QuEChERS* Products Fast, Simple Sample Prep for Multiresidue Pesticide Analysis Lit. Cat.#FFBR1183D-UNV Recuperado de: <http://www.restek.com/pdfs/FFBR1183D-UNV.pdf>
- Soria, M., (2015). *Aplicaciones del Grafeno en Biotecnología*.(Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Surlan, 2016, Figura cristalería equipo kuderna danish, Recuperado de:<http://www.surlan.hr/typo3temp/pics/1a2a0fddac.jpg>
- The NELAC Institute National Environmental Laboratory Accreditation Conference (2016), *Fields of Proficiency Testing (FoPT)*, Recuperado de <http://nelac-institute.org/content/NEPTP/fopt.php>
- Tornero, V., Hanke, G., (2016). Chemical Contaminants Entering the Marine Environment from Sea-Based Sources: A Review With a Focus on European Seas. *Marine Pollution Bulletin*. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.091>

TULSMA, Ministerio del Ambiente, (2015) *Acuerdo Ministerial 028 Sustituyese el Libro VI del Texto unificado de legislación secundaria* Recuperado de: <http://ecuadorforestal.org/wp-content/uploads/2010/05/Libro-VI-Calidad-Ambiental.pdf>

Umar, A., Umar, M. (2015). Microbial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs). A Review. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, Recuperado de: <http://www.ijser.org/paper/MICROBIAL-METABOLISM-OF-POLYCYCLIC-AROMATIC-HYDROCARBONS.html> ISSN 2229-5518

Villacres, E., (2015). *Análisis Toxicológico de Hidrocarburos Aplicado a la Salud Ocupacional*. (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Vives, I., Grimalt, J., Guitart, R. (2001). *Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos y la Salud Humana*. Recuperado de <http://www.higieneocupacional.com.br/download/hidrocarburos-vives.pdf>

Waters Corporation. 2012, *QuEChERS SimplifiCADO*, EE. UU. Waters Corporation Junio 2012 720003048ES IH-KK-FP Recuperado de <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003048es.pdf>

*WHO/EU Drinking Water Standards Comparative Table*. (1993-1998) Recuperado de <http://www.lennotech.com/who-eu-water-standards.htm#ixzz4Reh7C2rj>

World Health Organization (2003) Polynuclear aromatic hydrocarbons in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Recuperado de [www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/polyaromahydrocarbons.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/polyaromahydrocarbons.pdf)

World Health Organization (2011) Guidelines for drinking-water quality - 4th ed. Recuperado de [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/2011/dwq\\_guidelines/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/) ISBN 978 92 4 154815 1

World Health Organization Regional Office for Europe Copenhagen (2000). *Air Quality Guidelines for Europe*. Recuperado de [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0005/74732/E71922.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/74732/E71922.pdf)

World Health Organization Regional Office for Europe (2010) *WHO Guidelines for Indoor Air quality: Selected Pollutants*. Recuperado de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138705/pdf/Bookshelf\\_NBK138705.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138705/pdf/Bookshelf_NBK138705.pdf) ISBN 978 92 890 0213 4

World Health Organization Regional Office for Europe Copenhagen (2000). *Chapter 5.9 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*. Recuperado de: [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0015/123063/AQG2ndEd\\_5\\_9PAH.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0015/123063/AQG2ndEd_5_9PAH.pdf)

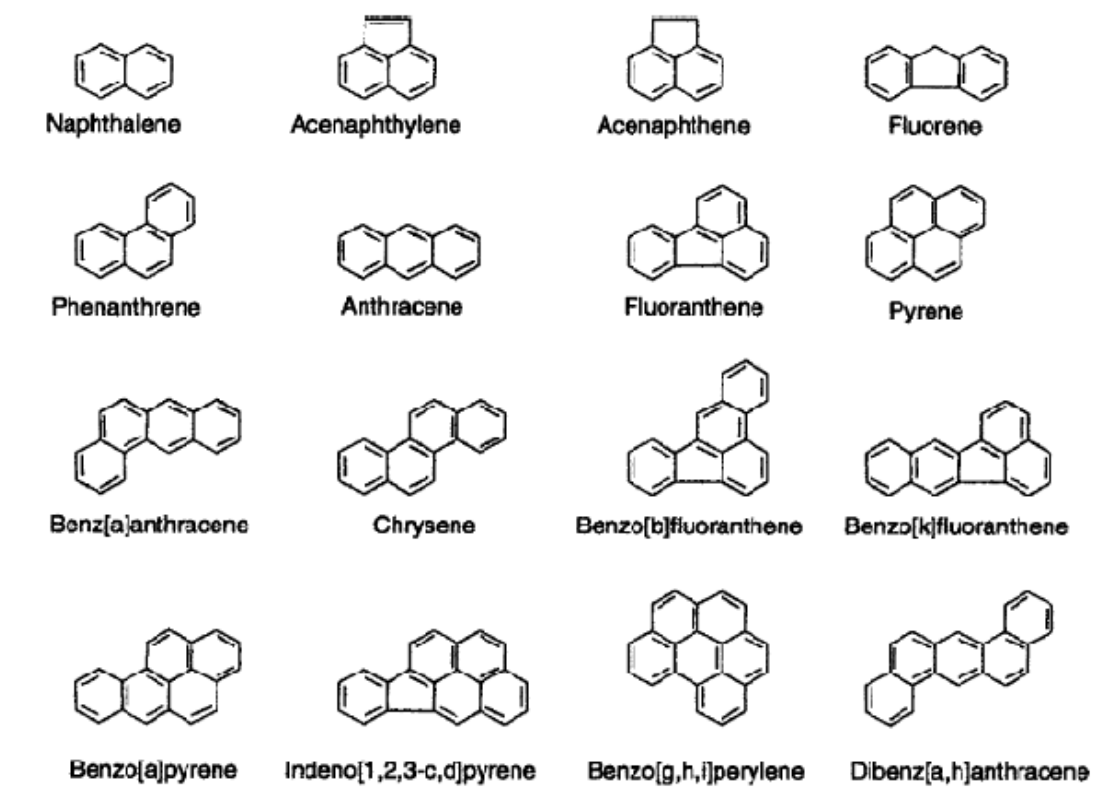
World Health Organization (2016). *Chemical hazards in drinking-water: Polynuclear aromatic hydrocarbons* Recuperado de: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/water-quality/guidelines/chemicals/polyaromahydrocarbons/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/water-quality/guidelines/chemicals/polyaromahydrocarbons/en/)  
[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/water-quality/guidelines/chemicals/polynuclear-aromatic-hydrocarbons-history.pdf?ua=1](http://www.who.int/water_sanitation_health/water-quality/guidelines/chemicals/polynuclear-aromatic-hydrocarbons-history.pdf?ua=1)

Young Michael S., Mark E. Benvenuti, Jennifer A. Burgess and Kenneth J. Fountain (2011) *Determination of PAH in Seafood: Optimized Sample Preparation Procedures For LC-Fluorescence Screening and GC-MS(MS) Confirmation*, Waters Corporation 720004162EN LS-PD, Recuperado de <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004126en.pdf>

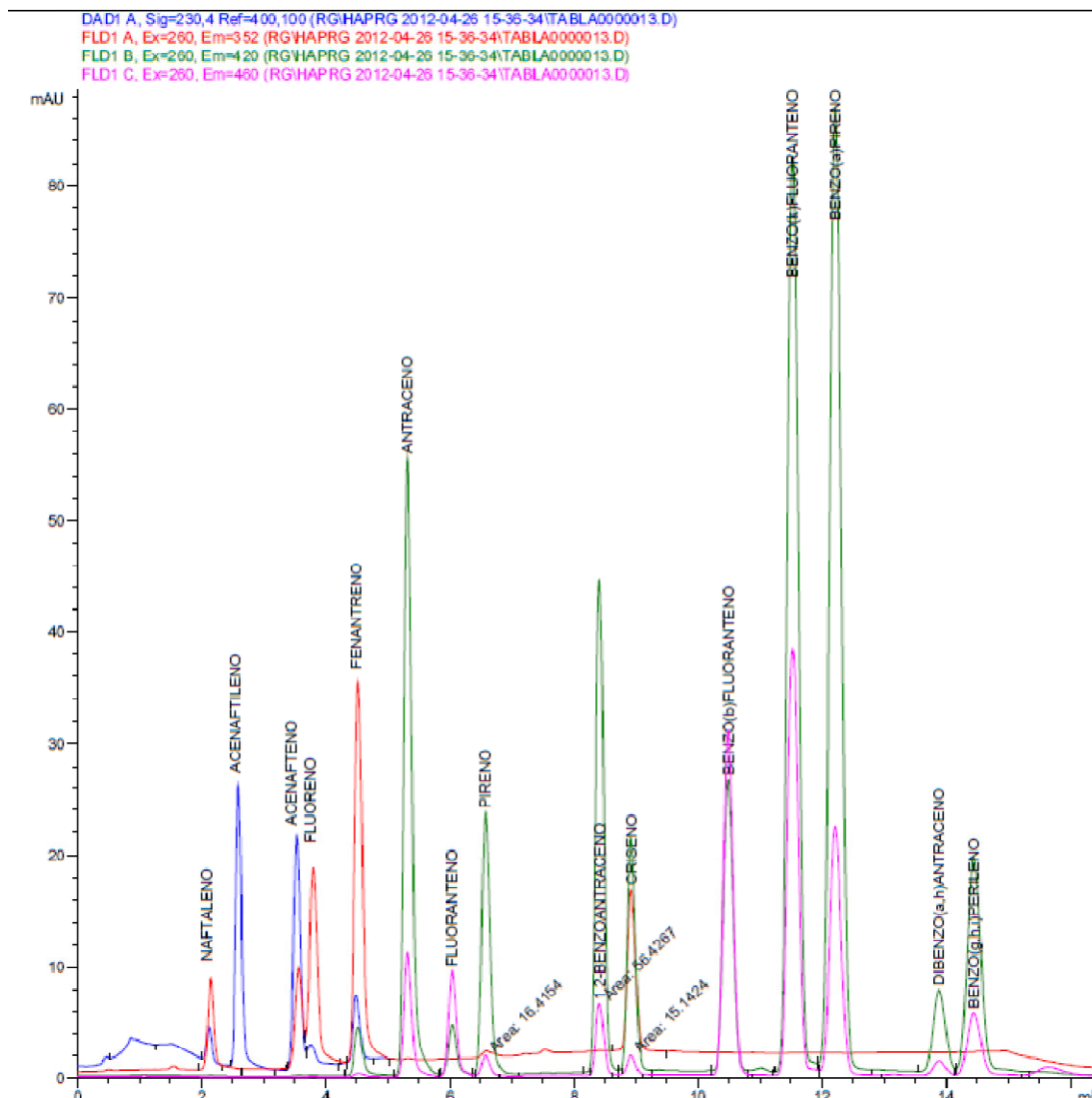
Zhang, J., Fan, S. K.,(2016). Influence of PAH Speciation in Soils on Vegetative Up Take of PAHs Using Successive Extraction. *Journal of Hazardous Materials* pp.2-4 Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.08.024>

Zhao Suli and Andy Zhai (2011), *Screening PAHs in Soil Using RTL Database with SampliQ QuEChERS Extraction Kits and Agilent 5975T LTM GC/MS*, Agilent Technologies 5990-6324EN, Recuperado de: <http://hpst.cz/sites/default/files/attachments/5990-6324en-screening-pahs-soil-using-rtl-sampliQ-QuEChERS-extraction-kits-and-5975t-ltm-gc-msd.pdf>

## FIGURAS



*Figura 1 Estructuras químicas de algunos HAPs(Umar 2015)*



**Figura 2 Cromatograma simultaneo UV/FLD (Gavilanes, 2013)**

En Gavilanes (2013) el detector UV se empleo a 230nm solo para la determinación de acenaftileno, para los demás HAPs se empleo la señal del FLD. Se puede observar el incremento de la señal en los picos de naftaleno, fluoreno, y fenantreno, cuando se usó el FLD (Excitación 260nm Emisión 352nm) líneas roja, verde y fucsia; comparativamente a la obtenida en elUV DAD línea azul el único caso donde la relación se invierte es el acenafteno donde la señal del detector UV es mayor a la del FLD. No se detalla la longitud de onda de absorción UV para el caso del naftaleno, acenafteno, fluoreno, y fenantreno.   
 Agilent ZORBAX Eclipse PAH C18 4.6x50mm, 1.8µm, 0.8 ml/min, Columna 18°C inyección 5 µl



**Figura 3 Aparatos para concentración Kuderna-Danish**

(Organomation, 2016) (Surlan, 2016)



**Figura 4 Bomba de Vacío y Manifold para extracción SPE**

(i.ytimg.com, 2016), (Cromlab, 2016)



***Figura 5 Equipo Rotavapor (Imlab, 2016)***

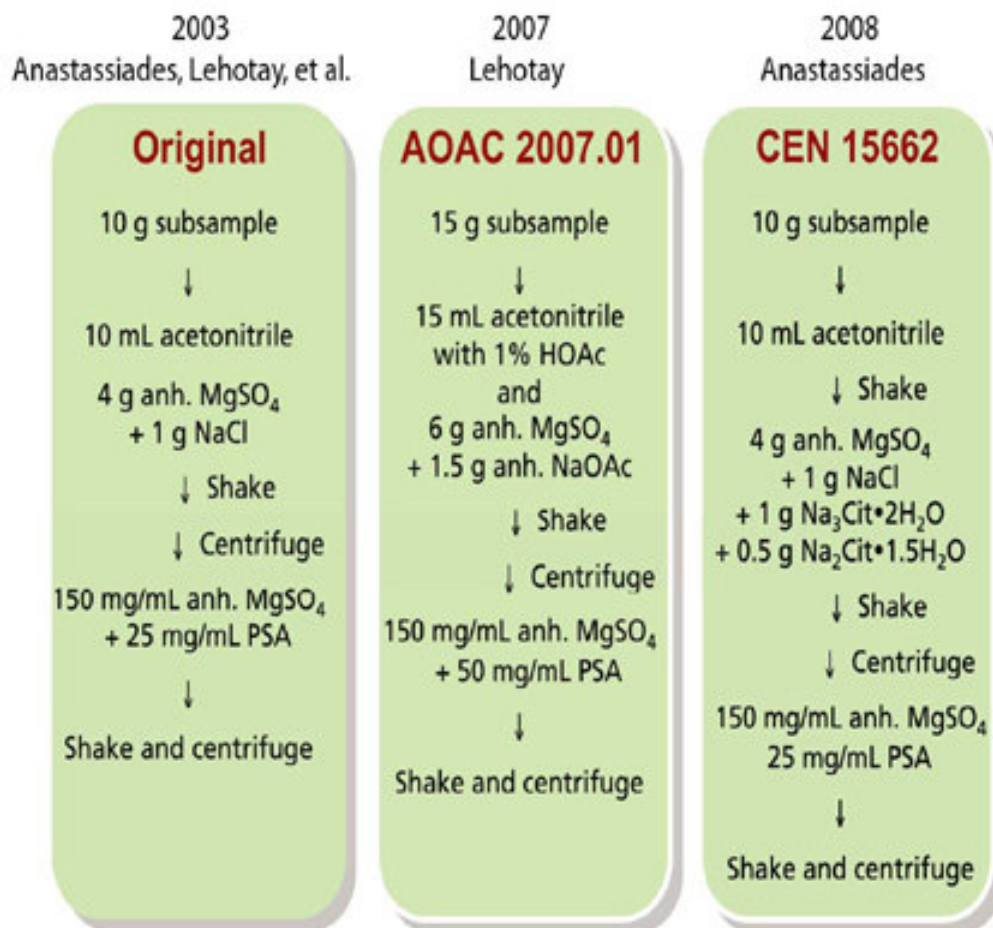


**Figura 6 Embudos de separación**

(i00.i.aliimg.com, 2016)



**Figura 7 Concentrador de nitrógeno**(bio-equip, 2016)



Some options: Scale up subsample sizes and reagents  
 Conduct freeze-out step to reduce lipid co-extractives  
 and/or 50 mg/mL extract of C18 sorbent in d-SPE  
 To reduce or remove chlorophyll, use 2.5–7.5 or 50 mg/mL GCB  
 For GC without LVI, solvent exchange and concentrate in toluene

**Figura 8 Variantes del método QuEChERS**

(Lehotay, Anastassiades y Majors, 2010)

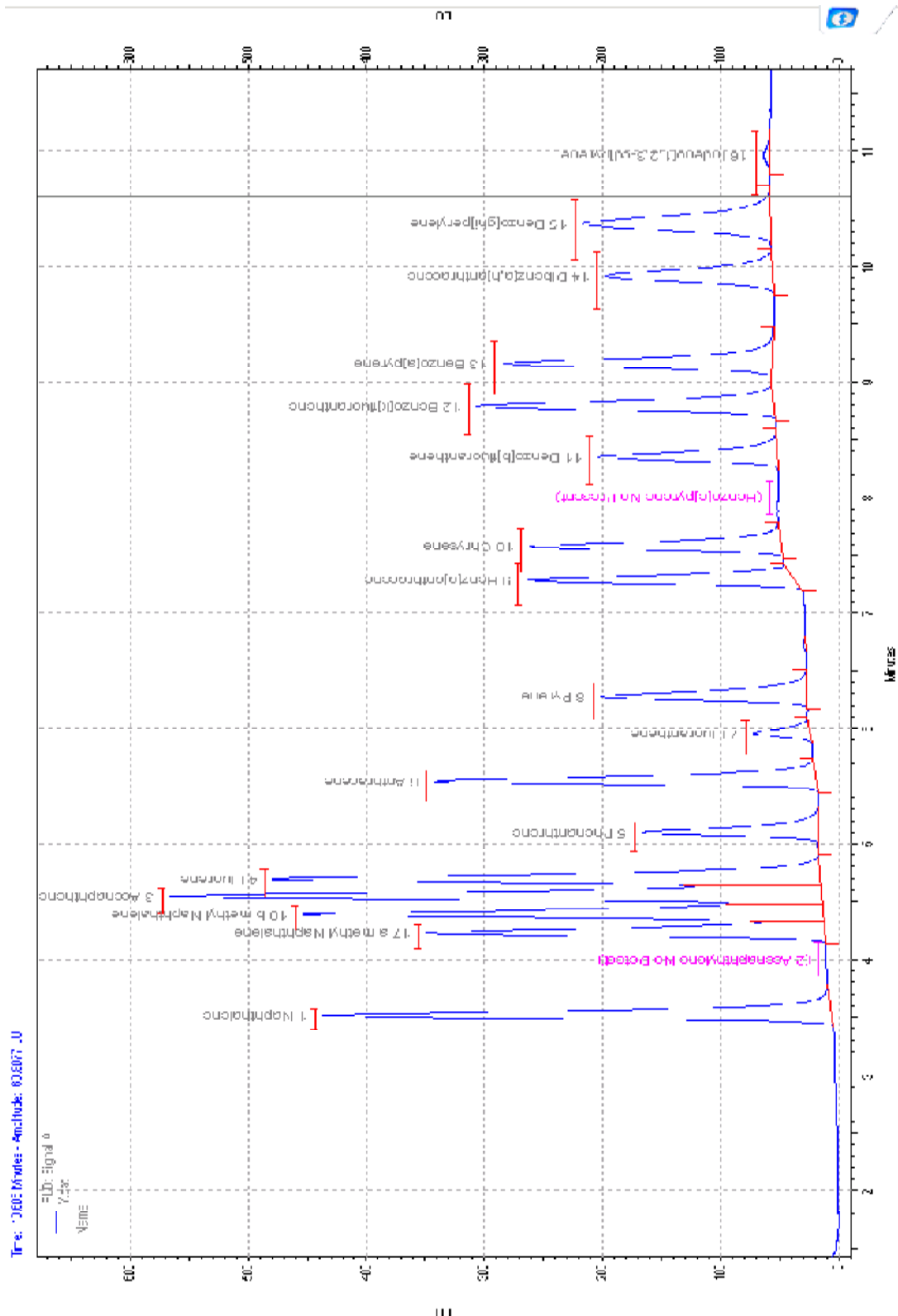


Figura 9 Cromatograma Estándar de calibración de HAPs

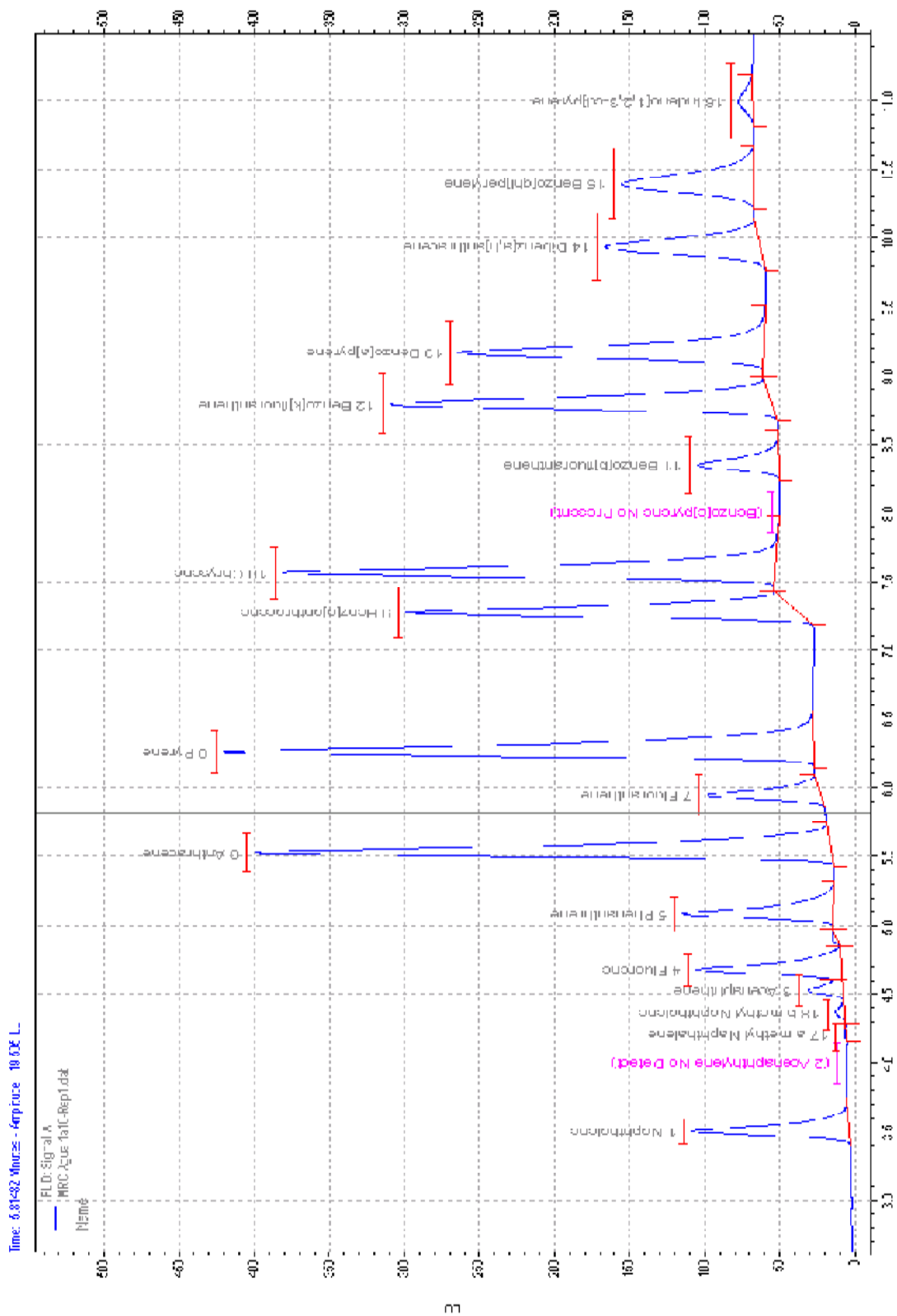
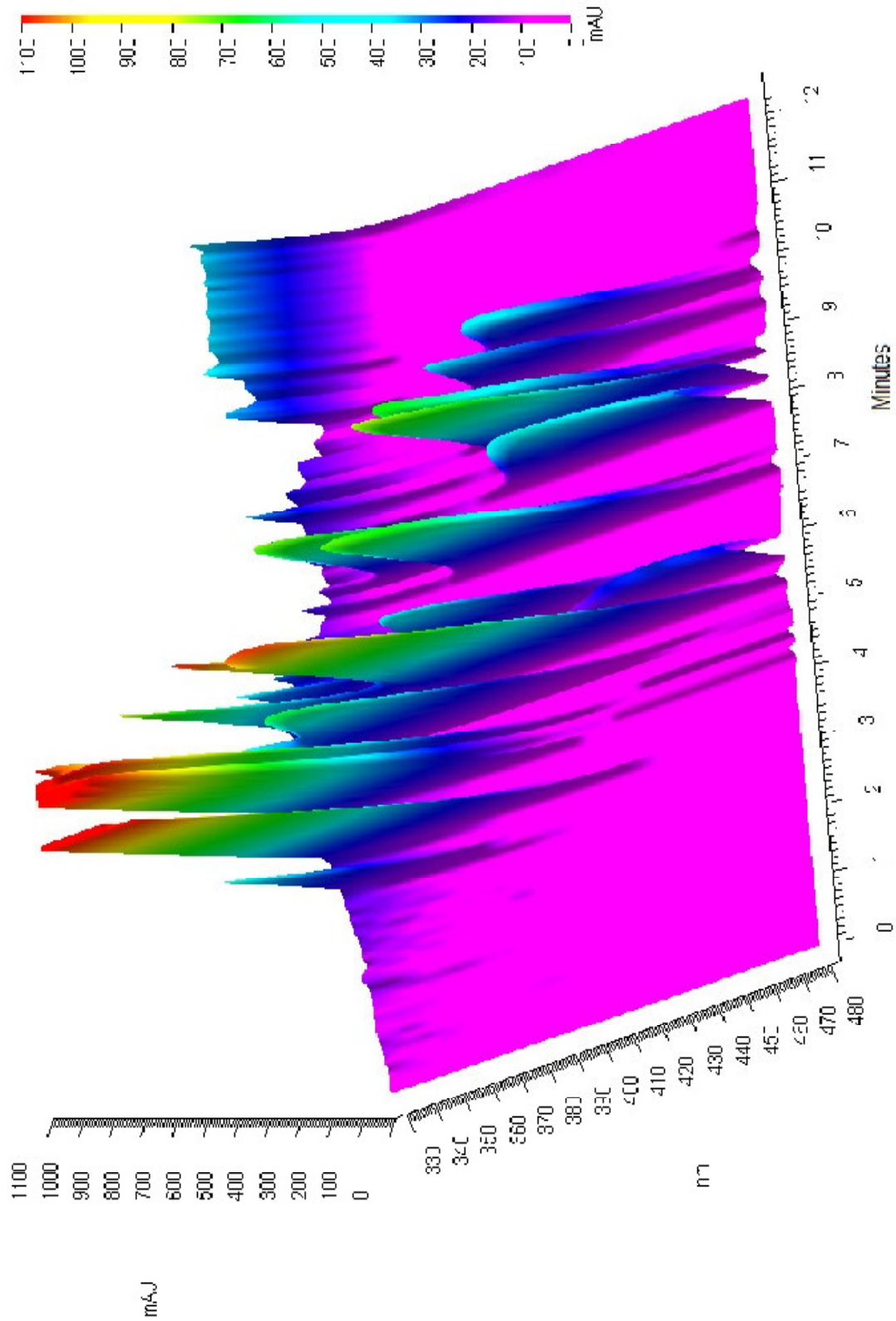
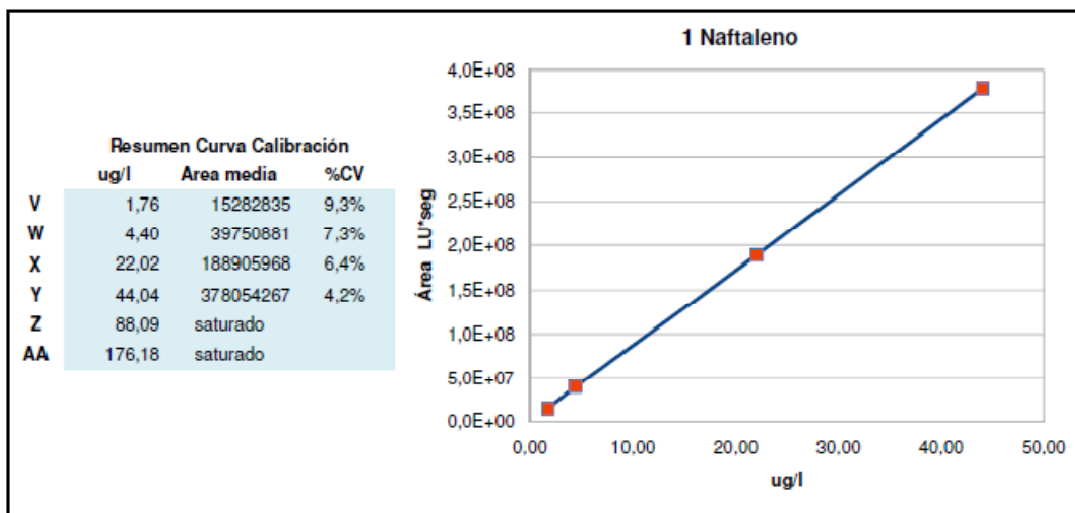


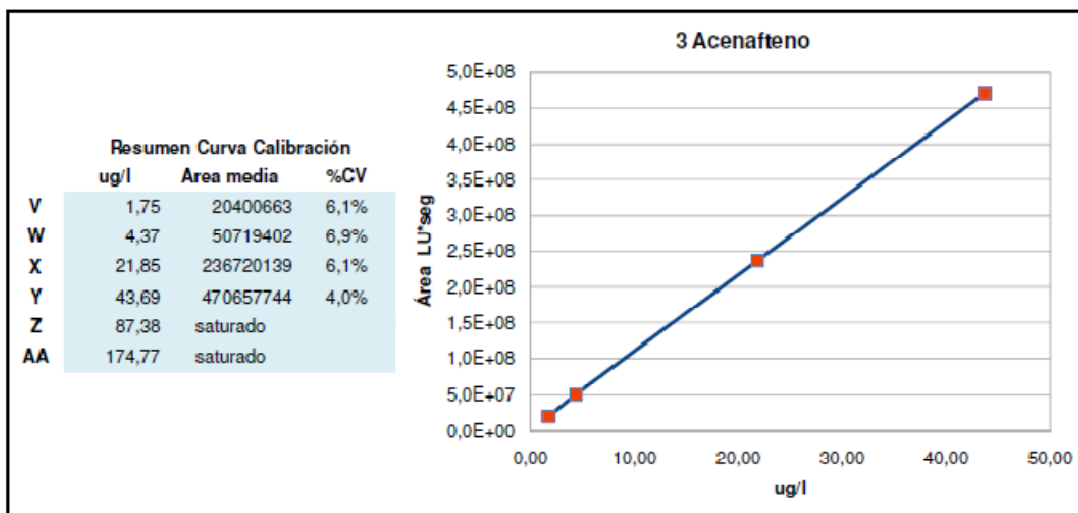
Figura 10 Cromatograma MRC Asequality



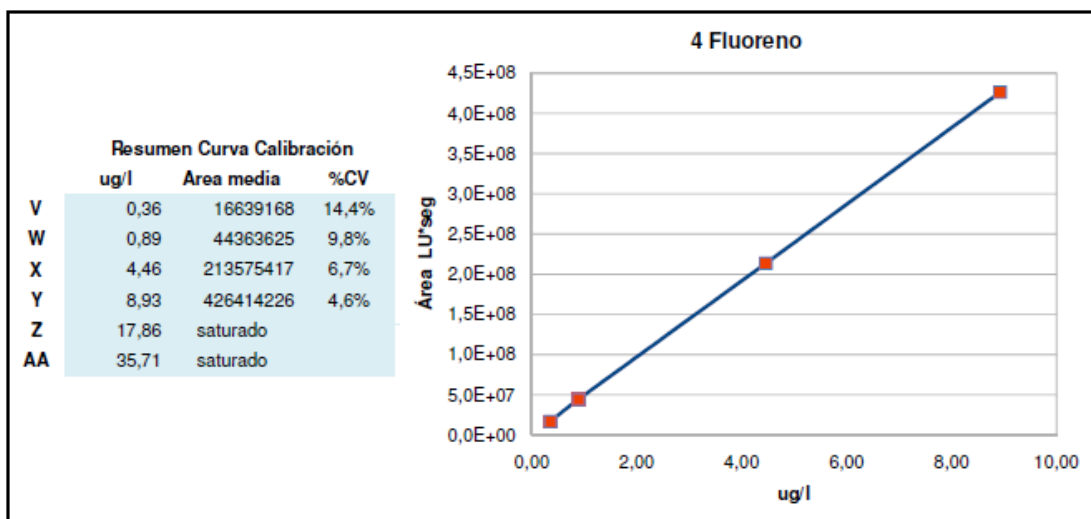
**Figura 11** Espectro de Fluorescencia obtenido en la optimización de señales



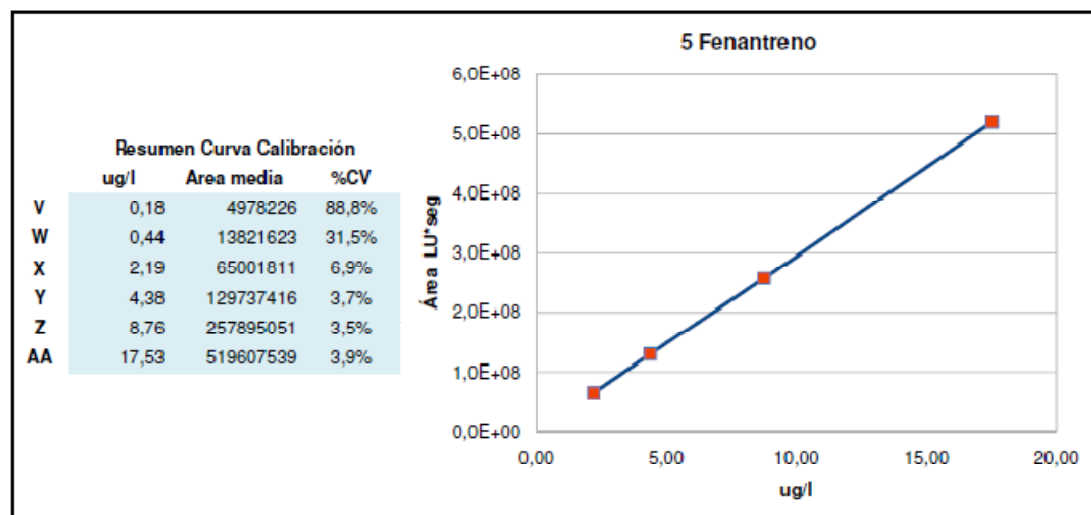
**Figura 12 Datos de calibración Naftaleno**



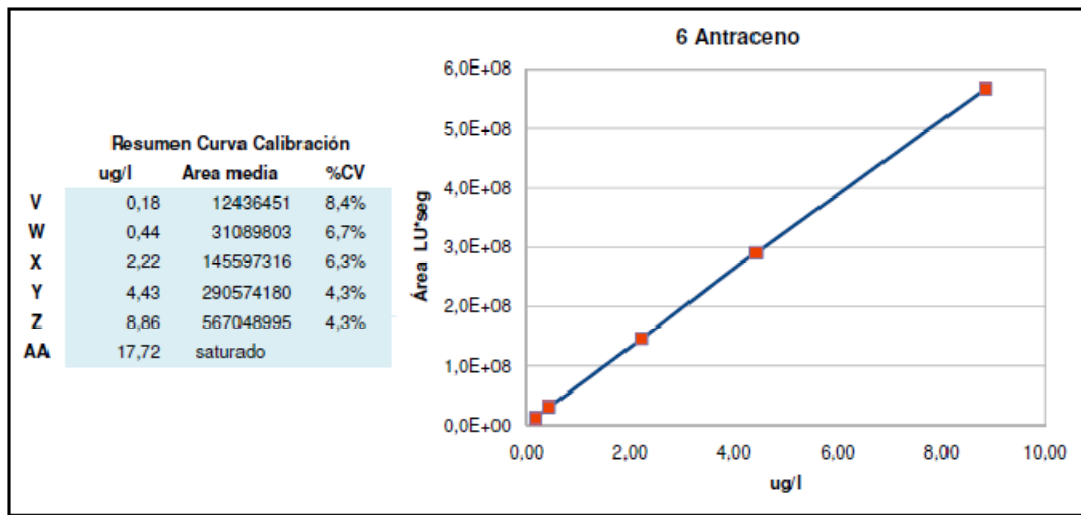
**Figura 13 Datos de calibración Acenafteno**



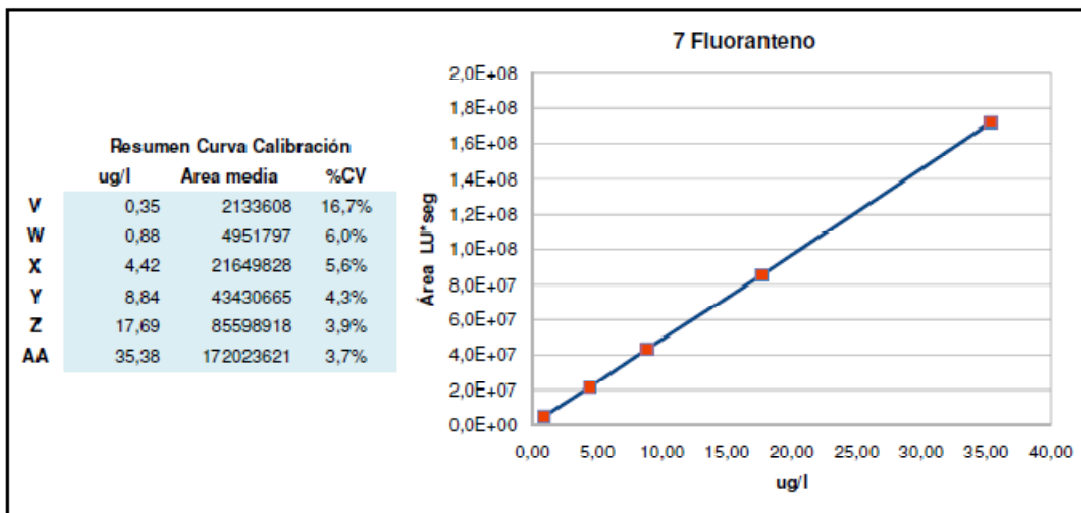
**Figura 14 Datos de calibración Fluoreno**



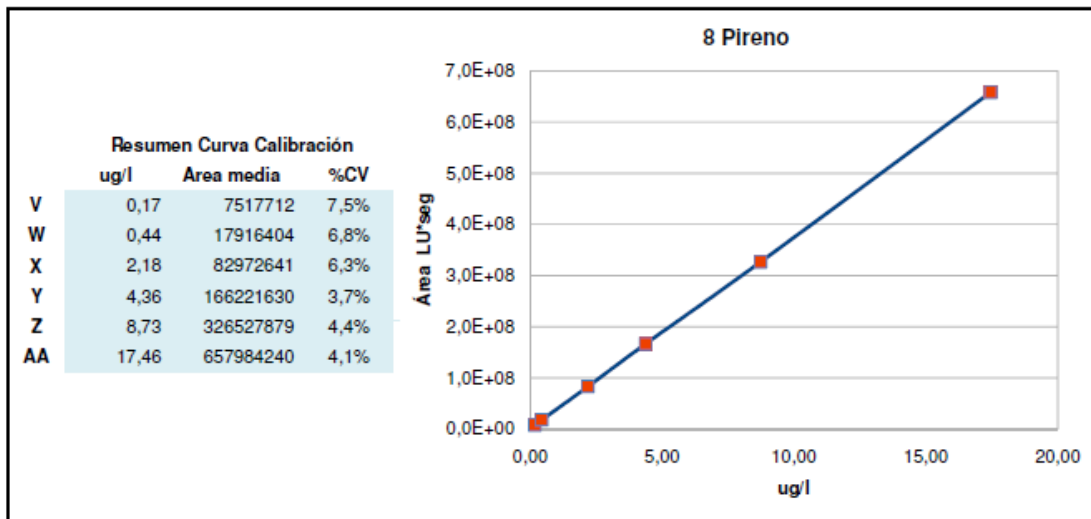
**Figura 15 Datos de calibración Fenantreno**



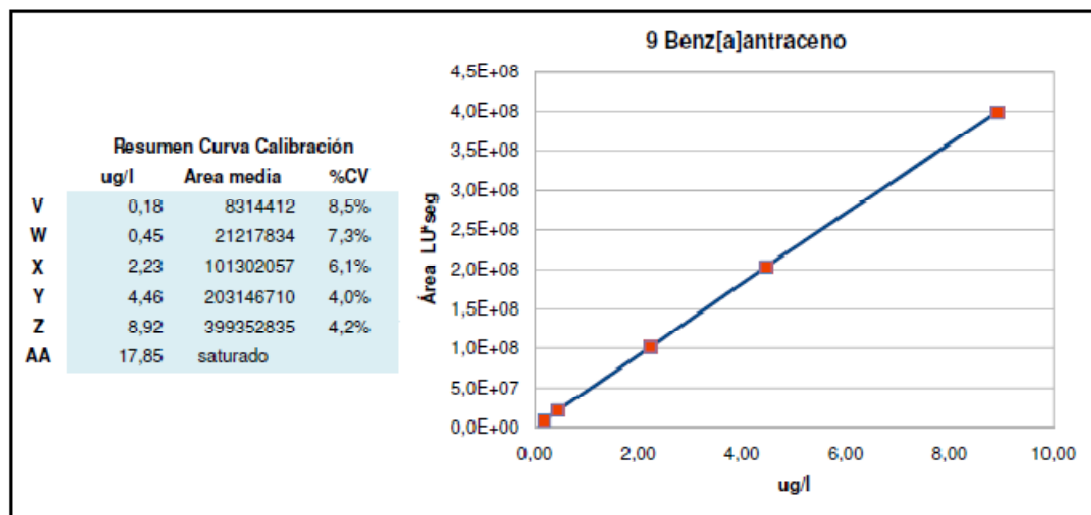
**Figura 16 Datos de calibración Antraceno**



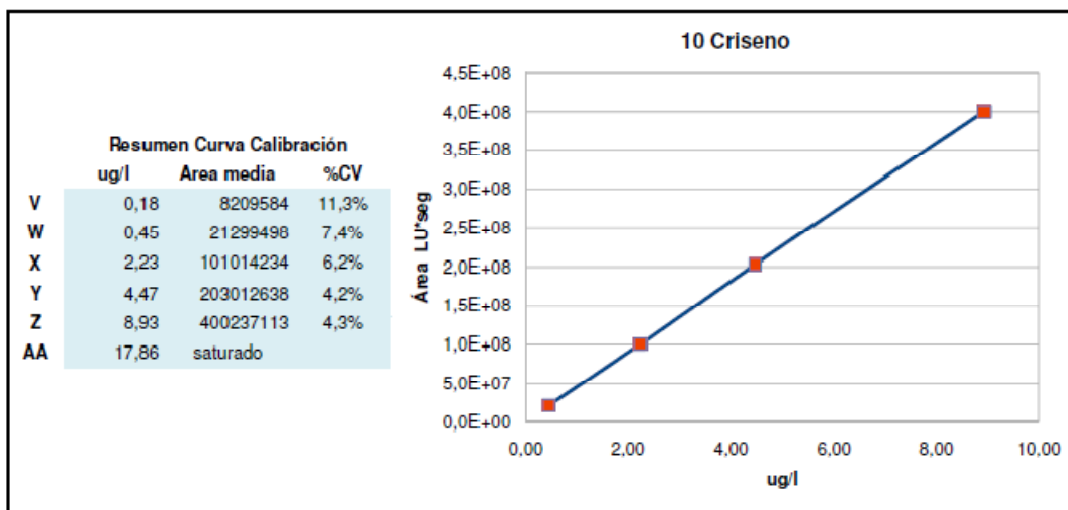
**Figura 17 Datos de calibración Fluoranteno**



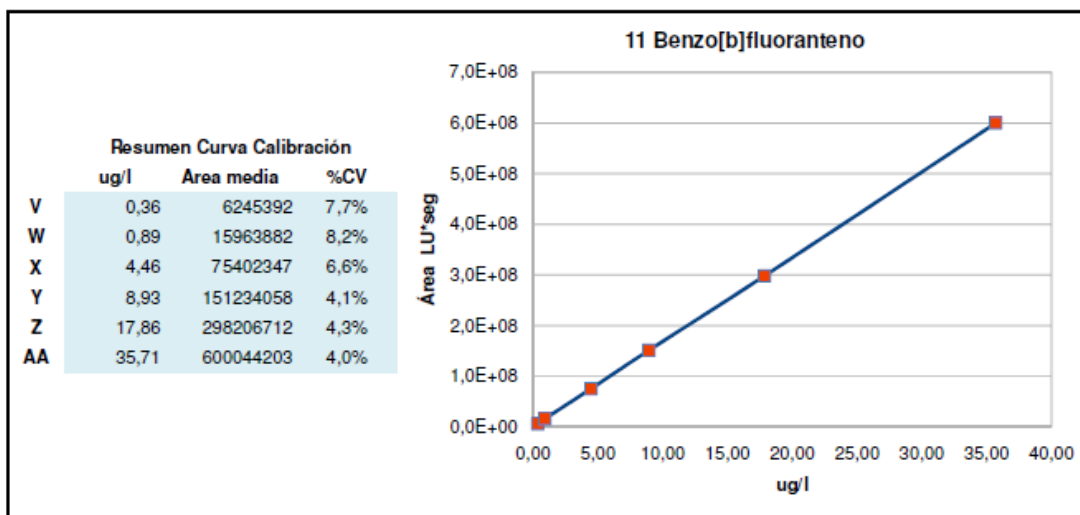
**Figura 18 Datos de calibración Pireno**



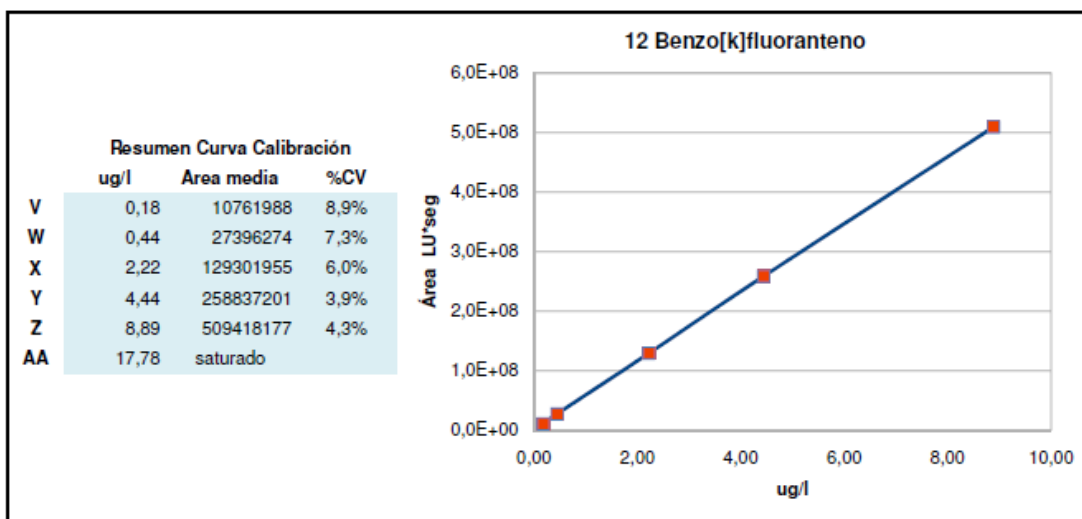
**Figura 19 Datos de calibración Benz(a)antraceno**



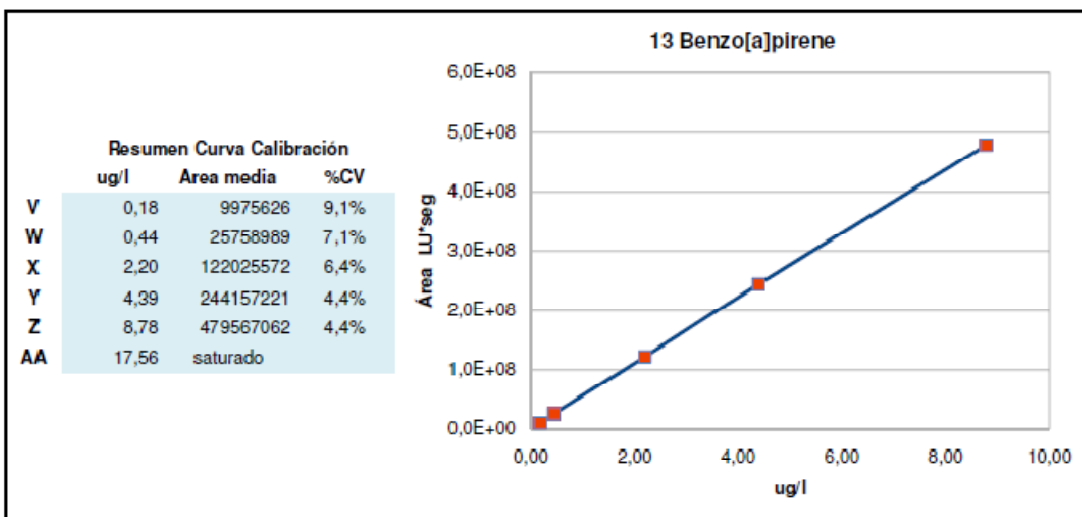
**Figura 20 Datos de calibración Criseno**



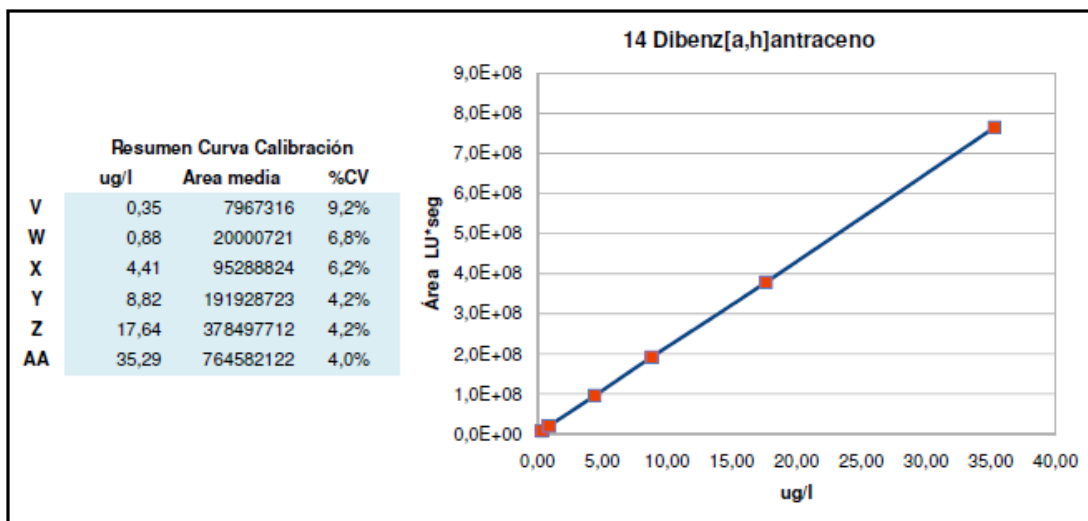
**Figura 21 Datos de calibración Benzo(b)fluoranteno**



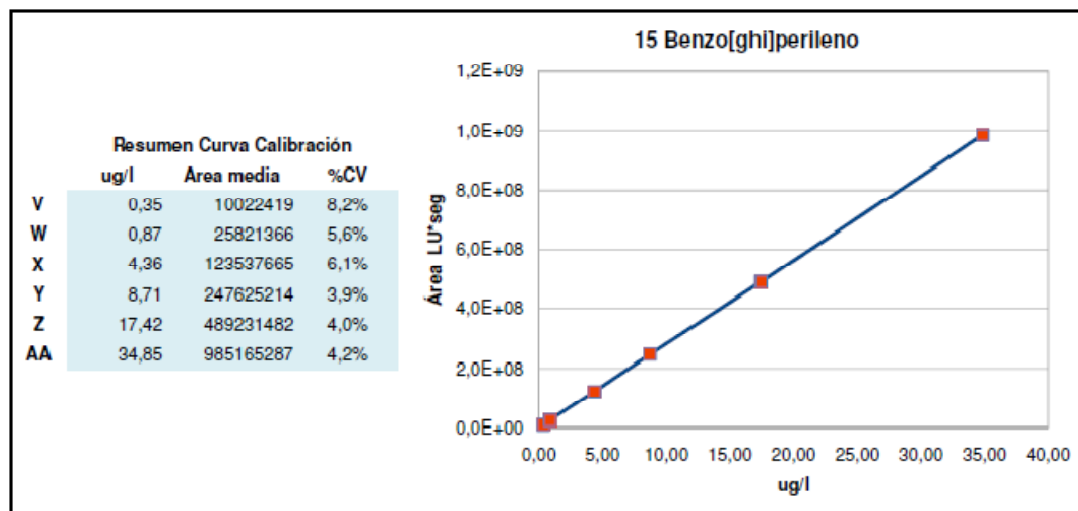
**Figura 22 Datos de calibración Benzo(k)fluoranteno**



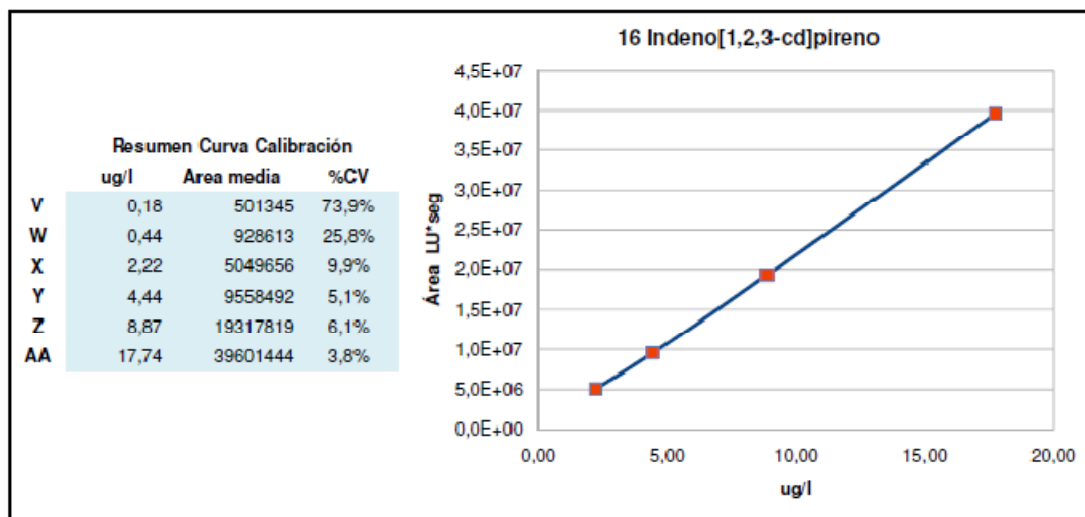
**Figura 23 Datos de calibración Benzo[a]pireno**



**Figura 24 Datos de calibración Dibenz(a,h)antraceno**



**Figura 25 Datos de calibración del Benzo(ghi)perileno**



**Figura 26 Datos de calibración Indeno(1,2,3-cd)pireno**

## TABLAS

**Tabla 1: Contenido de Benzo(a)Pireno en algunos alimentos**

<b>Alimento</b>	<b>Benzo[a]pireno (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>
Bacon	0,011
Chorizo	0,12-0,34
Jamón	0,009
Atún	0,023
Salmón	0,04
Trucha	0,057
Sardina	2,46
Bacalao	0,018
Arenque	0,04
Salchichas noruegas de carne ahumada	ND-0,15
Salchichas españolas de carne ahumada	ND-0,051
Pescado ahumado tailandés	ND-1220
Carne ahumada nigeriana	10,5-66,9
Pescado ahumado nigeriano	35,5-139
Aceite crudo de colza	2,46
Aceite refinado de colza	1,83
Aceite crudo de soja	1,13
Aceite refinado de soja	2,18
Otros aceites refinados (coco, girasol, oliva...)	1,91

(Vives et al, 2001)

**Tabla 2: Grupos de HAPs prioritarios EFSA**

HAPs4	HAPs8
Benzo[a]pireno	Benzo[a]pireno
Criseno	Benzo[a]antraceno
Benzo[a]antraceno	Benzo[b]fluoranteno
Benzo[b]fluoranteno	Benzo[k]fluoranteno
	Benzo[ghi]perileno
	Criseno
	Dibenzo[a,h]antraceno
	Indeno[123-cd]pireno

(Pérez, et al., 2016)

**Tabla 3: Potencial carcinógeno de algunos HAPs**

Potencial para producir cáncer de algunos HAPs	
HAPs	Potencial carcinógeno (RPF)
Benzo[a]pireno	1,000
Benzo[a]antraceno	0,145
Benzo[b]fluoranteno	0,167
Benzo[k]fluoranteno	0,020
Criseno	0,0044
Dibenzo[a,h]antraceno	1,11

(Patra, 2003)

RPF Relative Potency Factor Proporciona una metodología para estimar el riesgo de cáncer a partir de la exposición a mezclas de PAH sumando las dosis de PAHs componentes después de escalar las dosis (con RPF) con relación a la potencia de un PAH de índice, como el, benzo [a] pireno. (US EPA, 1993) (US EPA, 2012)

**Tabla 4: Clasificación de los HAPs según IARC**

<b>Clasificación de la International Agency for Research on Cancer para algunos HAPs</b>			
<b>HAPs</b>	<b>Categoría</b>	<b>HAPs</b>	<b>Categoría</b>
Benzo[a]pireno	1	Dibenzo[a,e]pireno	3
Criseno	2B	Dibenzo[a,i]pireno	2B
Benzo[a]antraceno	2B	Dibenzo[a,h]pireno	2B
Benzo[b]fluoranteno	2B	5-Metilcriseno	2B
Benzo[k]fluoranteno	2B	Benzo[c]fluoreno	3
Indeno[123-cd]pireno	2B	Naftaleno	2B
Dibenzo[a,h]antraceno	2A	Fenantreno	3
Benzo[ghi]perileno	3	Antraceno	3
Benzo[j]fluoranteno	2B	Fluoranteno	3
Ciclopenta[cd]pireno	2A	Pireno	3
Dibenzo[a,l]pireno	2A		

(Pérez, et al., 2016)

**Grupo 1:** cancerígeno para los seres humanos: hay suficiente evidencia para concluir que puede causar cáncer en los seres humanos.

**Grupo 2A:** probablemente carcinogénico para los seres humanos: Existe una fuerte evidencia de que puede causar cáncer en los seres humanos, pero en la actualidad no es concluyente.

**Grupo 2B:** posiblemente carcinogénico para los seres humanos: Hay algunas pruebas de que puede causar cáncer en los seres humanos, pero en la actualidad está lejos de ser concluyente.

**Grupo 3:** no clasificable en cuanto a la carcinogenicidad en seres humanos: No hay pruebas en la actualidad que provoca cáncer en los seres humanos.

**Grupo 4:** probablemente no es cancerígeno para los seres humanos: Hay pruebas sólidas de que no causa cáncer en los seres humanos.

**Tabla 5: Límites permisibles para la exposición al diclorometano**

<b>Organismo Emisor</b>	<b>Tipo de regulación</b>	<b>Límites de concentración</b>	<b>Observaciones</b>
<b>OSHA</b>	TWA	25 ppm 86,75mg/m <sup>3</sup>	Jornada Laboral 8h/día 40/semana
<b>OSHA</b>	STEL	125 ppm 433,75mg/m <sup>3</sup>	Máximo 15min/exposición no repetitiva
<b>OSHA</b>	Nivel de Acción	12,5ppm 43,375mg/m <sup>3</sup>	Concentración de la cual se deben iniciar controles
<b>NIOSH</b>	REL	Menor factible; carcinógeno	Límite recomendado
<b>ACGIH</b>	TWA	50ppm 173,5mg/m <sup>3</sup>	Jornada Laboral 8h/día 40/semana
<b>EPA</b>	Inhalation Reference Concentration (RfC)	0.6 mg/m <sup>3</sup>	Exposición diaria
<b>NIOSH</b>	IDLH:	2300 ppm 7981 mg/m <sup>3</sup>	Riesgo inmediato para la vida y salud
<b>ATSDR</b>	Inhalation Minimal Risk Levels (MRLs):	0.6 ppm 2,08 mg/m <sup>3</sup> aguda	Exposición diaria
		0.3 ppm 1,04 mg/m <sup>3</sup> intermedio y crónico	
<b>IARC</b>	Umbral de olor	200 ppm 694 mg/m <sup>3</sup>	IARC Monograph 1999

(OSHA Exposure Limits and Health Effects, 2012)

OSHA en Estados Unidos (Occupational Safety and Health Administration)

NIOSH (National Institute of Occupational Safety and Health)

ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists)

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)

**Tabla 6: Normas y Límites permisibles aplicables a los HAPs**

<b>Límites Máximos Permisibles en algunas Matrices</b>		
<b>Norma / Origen</b>	<b>Analitos</b>	<b>Límites / Matriz</b>
INEN 1108 Ed5 Ecuador 2011	Benzo(a)pireno	0,7 ug/L agua potable
EPA Primary standards US National Primary Drinking Water Regulations Estados Unidos 2016	Benzo(a)pireno	0,2 ug/L aguas potables y subterráneas
WHO's Guidelines for Drinking-water Quality 2011	Benzo(a)pireno	0,7 ug/L agua potable
Council Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption. Adopted by the Council, on 3 November 1998 Comunidad Europea	Benzo(a)pireno benzo(b)fluoranteno benzo(k)fluoranteno benzo(ghi)perileno indeno(1,2,3-cd)pireno	0,010ug/L agua potable 0,1ug/L suma de agua potable
Guidance on the implementation of the water supply (water quality) regulations 2000 (as amended) in England Reino Unido 2012	Benzo(a)pireno	0,01ug/L agua potable
Guidance on the implementation of the water supply (water quality) regulations 2010 in Wales Reino Unido 2010	Benzo(a)pireno	0,01ug/L agua potable

### Normas y Límites permisibles aplicables a los HAPs (continuación...)

Norma / Origen	Analitos	Límites / Matriz
Tuluma Registro Oficial 270 13/02/2015	No define compuestos	Establece control de HAPs para descargas de la industria petrolera pero no define límites p102
	Naftaleno	0,1-22 mg/Kg
	Fenantreno	0,1-50 mg/Kg
	Antraceno	0,1-100 mg/Kg
	Fluoranteno	0,1-100 mg/Kg
	Pireno	0,1-100 mg/Kg
	Benz[a]antraceno	0,1-10 mg/Kg
	Criseno	0,1-100 mg/Kg
	Benzo[b]fluoranteno	0,1-10 mg/Kg
	Benzo[k]fluoranteno	0,1-10 mg/Kg
	Benzo[a]pireno	0,1-10 mg/Kg
	Dibenz[a,h]antraceno	0,1-10 mg/Kg
	Indeno[1,2,3-cd]pireno	0,1-10 mg/Kg
HAPs cada tipo	0,1mg/Kg Suelos	
RAOH Decreto Ejecutivo 1215, Registro Oficial 265 de 13 de Febrero del 2001	Fluoranteno Benzo[b]fluoranteno Benzo[k]fluoranteno Benzo[a]pireno	0,2ug/l promedio anual 0,3ug/l-0,5ug/l suma Descarga lixiviados
Ecuador Edición 29-sep-2010	Benzo[ghi]perileno Indeno[1,2,3-cd]pireno	1000 - 5000ug/Kg suma en Suelos

### Normas y Límites permisibles aplicables a los HAPs (continuación)

Norma / Origen	Analitos	Límites / Matriz
TULAS Libro 6 Anexo 1  Ecuador 2001 Reemplazada por Registro oficial 270	Naftaleno	aguas subterráneas 35 ug/l
	Fenantreno.	2,5 ug/l
	Antraceno	2,5 ug/l
	Fluoranteno	0,5 ug/l
	Benzo(a)antraceno	0,25 ug/l
	Criseno	0,026 ug/l
	Benzo(k)fluoranteno	0,026 ug/l
	Benzo(a)pireno	0,026 ug/l
	Benzo(ghi)perileno	0,025 ug/l
	Indenol (1,2,3 cd) pireno	0,025 ug/l
	Benzo(a)pireno	Aguas de Consumo 0,01 ug/l
	No define compuestos	Establece control de HAPs para descargas de la industria petrolera pero no define límites p28
Resolución 0002-SA-2014	HAPs cada tipo	0,1-5mg/Kg
Distrito Metropolitano de Quito del 20/01/2014		Suelos
	Benz[a]antraceno	0,1-0,7mg/Kg
	Benzo[a]pireno	0,1-5mg/Kg
	Naftaleno	0,1-22mg/Kg
	Pireno	0,1-10mg/Kg
		Suelos

Elaborado a partir de la bibliografía ambiental (revisado hasta el 01 de diciembre de 2016)

**Tabla 7: Resumen Técnicas Instrumentales para el análisis de HAPs**

<b>Técnica analítica</b>	<b>Métodos Estandarizados</b>
Cromatografía de Gases con detección de ionización de flama GC-FID	US EPA 8100 (1986)
	US EPA 610 (1984)
	Standard Methods 6440b (APHA 2012)
	NIOSH 5515 (1994)
Cromatografía de Gases con detector de masas específicas GC-MSD	US EPA 525.2 (1995)
	US EPA 1625 (1984)
	US EPA 8270 (1998)
	Standard Methods 6410b (APHA 2012)
Cromatografía Líquida con detector de ultravioleta y/o fluorescencia HPLC-UV/FLD	US EPA 550 (1990)
	US EPA 550.1 (1990)
	US EPA 610 (1984)
	US EPA 8310 (1986)
	Standard Methods 6440b (APHA 2012)
	US FDA 4475 (2010)
	NIOSH 5506 (1998)
USGS O-3113-83 (1983)	

En la fase de extracción, para el EPA 8100 y 8310 no se recomienda ajuste de pH, para el EPA 8270 el pH se ajusta a <2.

Para el método EPA8310, el diclorometano debe intercambiarse por acetonitrilo para la inyección en el HPLC, no recomiendan otro solvente para clean-up.

Para el método EPA8100 se recomienda ciclohexano como solvente para clean-up. No se requiere cambio de solvente para la inyección en el GC así también para el EPA8270.

Para el método de extracción 3535 no se requieren ajuste de pH para HAPs

**Tabla 8: Resumen de los métodos de extracción estandarizados para HAPs**

<b>Forma de extracción</b>	<b>Solventes usados</b>	<b>Análisis por GC</b>	<b>Análisis por HPLC</b>	<b>Equipos</b>
Líquido – Líquido Muestra 1L	Diclorometano	Inyección directa de Diclorometano	Cambio de solvente a Acetonitrilo	Embudos de separación Concentrador KD
SPE discos Cartuchos SDB-XC C 18 Muestra 1L	Metanol Acetona Acetato de Etilo Diclorometano	Inyección directa de Diclorometano o cambio a Diclorometano	Cambio de solvente a Acetonitrilo	Cartuchos o discos SPE Manifold Bomba de vacío Concentrador KD

**Tabla 9: Precisión y Exactitud métodoEPA 8310**METHOD ACCURACY AND PRECISION AS FUNCTIONS OF CONCENTRATION<sup>a</sup>

Parameter	Accuracy, as recovery, $x'$ (ug/L)	Single analyst precision, $s_r'$ (ug/L)	Overall precision, $S'$ (ug/L)
Acenaphthene	0.52C+0.54	0.39 $\bar{x}$ +0.76	0.53 $\bar{x}$ +1.32
Acenaphthylene	0.69C-1.89	0.36 $\bar{x}$ +0.29	0.42 $\bar{x}$ +0.52
Anthracene	0.63C-1.26	0.23 $\bar{x}$ +1.16	0.41 $\bar{x}$ +0.45
Benzo(a)anthracene	0.73C+0.05	0.28 $\bar{x}$ +0.04	0.34 $\bar{x}$ +0.02
Benzo(a)pyrene	0.56C+0.01	0.38 $\bar{x}$ -0.01	0.53 $\bar{x}$ -0.01
Benzo(b)fluoranthene	0.78C+0.01	0.21 $\bar{x}$ +0.01	0.38 $\bar{x}$ -0.00
Benzo(ghi)perylene	0.44C+0.30	0.25 $\bar{x}$ +0.04	0.58 $\bar{x}$ +0.10
Benzo(k)fluoranthene	0.59C+0.00	0.44 $\bar{x}$ -0.00	0.69 $\bar{x}$ +0.10
Chrysene	0.77C-0.18	0.32 $\bar{x}$ -0.18	0.66 $\bar{x}$ -0.22
Dibenzo(a,h)anthracene	0.41C-0.11	0.24 $\bar{x}$ +0.02	0.45 $\bar{x}$ +0.03
Fluoranthene	0.68C+0.07	0.22 $\bar{x}$ +0.06	0.32 $\bar{x}$ +0.03
Fluorene	0.56C-0.52	0.44 $\bar{x}$ -1.12	0.63 $\bar{x}$ -0.65
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	0.54C+0.06	0.29 $\bar{x}$ +0.02	0.42 $\bar{x}$ +0.01
Naphthalene	0.57C-0.70	0.39 $\bar{x}$ -0.18	0.41 $\bar{x}$ +0.74
Phenanthrene	0.72C-0.95	0.29 $\bar{x}$ +0.05	0.47 $\bar{x}$ -0.25
Pyrene	0.69C-0.12	0.25 $\bar{x}$ +0.14	0.42 $\bar{x}$ -0.00

$x'$  - Expected recovery for one or more measurements of a sample containing a concentration of C, in ug/L.

$s_r'$  - Expected single analyst standard deviation of measurements at an average concentration of  $\bar{x}$ , in ug/L.

$S'$  - Expected interlaboratory standard deviation of measurements at an average concentration found of  $\bar{x}$ , in ug/L.

C - True value for the concentration, in ug/L.

$\bar{x}$  - Average recovery found for measurements of samples containing a concentration of C, in ug/L.

(US EPA 8310, 1986)

**Tabla 10: Desvío y Exactitud de Standard Methods 6440(APHA, 2012)**

TABLE 6440:IV. METHOD BIAS AND PRECISION AS FUNCTIONS OF CONCENTRATION\*

Compound	Bias as Recovery, $X'$ $\mu\text{g/L}$	Single- Analyst Precision, $s_r$ $\mu\text{g/L}$	Overall Precision, $S$ $\mu\text{g/L}$
Acenaphthene	$0.52C + 0.54$	$0.39\bar{X} + 0.76$	$0.53\bar{X} + 1.31$
Acenaphthylene	$0.69C - 1.89$	$0.36\bar{X} + 0.29$	$0.42\bar{X} + 0.52$
Anthracene	$0.63C - 1.26$	$0.23\bar{X} + 1.16$	$0.41\bar{X} + 0.45$
Benzo(a)anthracene	$0.73C + 0.05$	$0.28\bar{X} + 0.04$	$0.34\bar{X} + 0.02$
Benzo(a)pyrene	$0.56C + 0.01$	$0.38\bar{X} + 0.01$	$0.53\bar{X} - 0.01$
Benzo(b)fluoranthene	$0.78C + 0.01$	$0.21\bar{X} + 0.01$	$0.38\bar{X} - 0.00$
Benzo(ghi)perylene	$0.44C + 0.30$	$0.25\bar{X} + 0.04$	$0.58\bar{X} + 0.10$
Benzo(k)fluoranthene	$0.59C + 0.00$	$0.44\bar{X} - 0.00$	$0.69\bar{X} + 0.01$
Chrysene	$0.77C - 0.18$	$0.32\bar{X} - 0.18$	$0.66\bar{X} - 0.22$
Dibenzo(a,h)anthracene	$0.41C + 0.11$	$0.24\bar{X} + 0.02$	$0.45\bar{X} + 0.03$
Fluoranthene	$0.68C + 0.07$	$0.22\bar{X} + 0.06$	$0.32\bar{X} + 0.03$
Fluorene	$0.56C - 0.52$	$0.44\bar{X} - 1.12$	$0.63\bar{X} - 0.65$
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	$0.54C + 0.06$	$0.29\bar{X} + 0.02$	$0.42\bar{X} + 0.01$
Naphthalene	$0.57C - 0.70$	$0.39\bar{X} - 0.18$	$0.41\bar{X} + 0.74$
Phenanthrene	$0.72C - 0.95$	$0.29\bar{X} + 0.05$	$0.47\bar{X} - 0.25$
Pyrene	$0.69C - 0.12$	$0.25\bar{X} + 0.14$	$0.42\bar{X} - 0.00$

\*  $X'$  = expected recovery for one or more measurements of a sample containing a concentration of  $C$ ,  
 $s_r$  = expected single-analyst standard deviation of measurements at an average concentration found of  $\bar{X}$ ,  
 $S$  = expected interlaboratory standard deviation of measurements at an average concentration found of  $\bar{X}$ ,  
 $C$  = true value for concentration, and  
 $\bar{X}$  = average recovery found for measurements of samples containing a concentration of  $C$ .

**Tabla 11: Criterios aceptación FoPT (TNI NELAC, 2016)**

**TNI/NELAP PT for Accreditation**  
**Fields of Proficiency Testing with PTRLs**  
**Non-Potable Water (NPW)**  
**Effective Date: April 1, 2016**

Analyte	Conc Range	Acceptance Criteria				NELAC PTRL
Base/Neutrals	$\mu\text{g/L}$	a	b	c	d	ptrl $\mu\text{g/L}$
Acenaphthene	10 to 200	0,7748	0,8506	0,1427	0,1159	4,0
Acenaphthylene	10 to 200	0,8029	-0,2974	0,1485	0,1111	2,9
Anthracene	10 to 200	0,7986	1,7870	0,1229	0,7303	3,9
Benzo(a)anthracene	10 to 200	0,8381	0,5699	0,1162	0,6075	3,6
Benzo(a)pyrene	10 to 200	0,8207	-0,0550	0,1484	0,4349	2,4
Benzo(b)fluoranthene	20 to 200	0,8327	0,1531	0,1497	0,1078	7,5
Benzo(g,h,i)perylene	10 to 200	0,8261	1,5562	0,1556	0,0166	5,1
Benzo(k)fluoranthene	20 to 200	0,8223	1,996	0,1862	1,126	7,7
Chrysene	10 to 200	0,8180	2,3274	0,1351	0,2137	5,8
Dibenzo(a,h)anthracene	20 to 200	0,8079	2,3890	0,1497	0,8729	6,9
Fluoranthene	30 to 200	0,8087	2,9863	0,1272	0,0642	15,6
Fluorene	10 to 200	0,7619	3,7583	0,1165	1,0349	4,8
Indeno(1,2,3, cd)pyrene	30 to 200	0,7115	5,0289	0,1430	1,4299	9,2
Naphthalene	20 to 200	0,6749	3,5514	0,1441	1,2975	4,5
Phenanthrene	10 to 200	0,8001	2,8698	0,1110	0,9485	4,7
Pyrene	10 to 200	0,8476	1,0097	0,1490	0,0530	4,9

Acceptance limits are set at the Mean  $\pm$  3 SD

Where the a, b, c and d factors are presented, Mean =  $a \cdot T + b$ ; SD =  $c \cdot T + d$  where T is the assigned value.

**Tabla 12: Recuperación EPA8330 por SALLE y método tradicional**

Analyte	EXTRACTANT		
	Methylene chloride	Methylene chloride + NaCl	Acetonitrile + NaCl
HMX	23.6	73.6	95.6
RDX	59.6	83.1	93.9
TNB	88.1	92.7	96.5
DNB	89.9	94.5	95.6
NB	89.7	95.7	94.2
TNT	94.0	96.3	98.9
2,4DNT	94.4	96.5	98.0
2,6DNT			97.9
2ADNT			96.5
2NT			96.9
3NT			96.9
4NT			97.1
NG			99.7
PETN			>99.9

\*Pooled standard deviation for all analytes except HMX was 0.9%. For HMX it was 4%.

HMX is octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine

RDX is hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5,7-triazine

TNB is 1,3,5-trinitrobenzene

DNB is 1,3-dinitrobenzene

NB is nitrobenzene

TNT is 2,4,6-trinitrotoluene

2,4DNT is 2,4-dinitrotoluene

2,6DNT is 2,6-dinitrotoluene

2ADNT is 2-amino-4,6-dinitrotoluene

2NT is 2-nitrotoluene

3NT is 3-nitrotoluene

4NT is 4-nitrotoluene

NG is glyceryl trinitrate

PETN is pentaerythritol trinitrate

(Majors, 2009).

**Tabla 13: Cantidad de agua adicionada según humedad de la muestra**

Tipo de muestra	Peso de la muestra	Agua agregada	Nota
Frutas y verduras con >80 % de contenido de agua	10 g	-	
Frutas y verduras con 25-80 % de contenido de agua	10 g	X g	X = 10 g: cantidad de agua en una muestra de 10 g
Cereales	5 g	10 g	
Frutos secos	5 g	7,5 g	Se puede agregar agua durante el paso de trituración
Miel	5 g	10 g	
Especias	2 g	10 g	

Directrices del método del CEN para agregar agua a productos con bajo contenido de agua.

(Waters, 2012).

**Tabla 14: Condiciones instrumentales**

<b>Condiciones Instrumentales</b>		
<b>Flujo</b>	1.00 mL/min	
<b>Fase Móvil</b>	A = Agua	B = Acetonitrilo
<b>Gradiente:</b>	Tiempo (min)	% B
	0.00	45
	7.00	100
	11.30	100
	11,90	45
<b>Stop time</b>	13,00	
<b>Post run</b>	1,00	
<b>Temp.:</b>	25 °C	
<b>Inyección:</b>	5,0 µL	

**Tabla 15: Tiempo de retención y longitudes de onda FLD**

<b>Num</b>	<b>Analito</b>	<b>Tiempo Retención</b>	<b>Emisión nm</b>	<b>Excitación nm</b>
1	Naftaleno	3,503	224	335
3	Acenafteno	4,529	269	327
4	Fluoreno	4,676	269	327
5	Fenantreno	5,087	250	364
6	Antraceno	5,53	252	399
7	Fluoranteno	5,944	234	468
8	Pireno	6,264	265	380
9	Benz(a)antraceno	7,279	280	397
10	Criseno	7,574	265	375
11	Benzo(b)fluoranteno	8,356	260	439
12	Benzo(k)fluoranteno	8,802	255	419
13	Benzo[a]pireno	9,173	260	411
14	Dibenz(a,h)antraceno	9,947	280	403
15	Benzo(ghi)perileno	10,404	290	420
16	Indeno(1,2,3-cd)pireno	11,009	293	485

**Tabla 16: Concentraciones Solución Madre y Stock**

<b>Analito</b>	<b>#CAS</b>	<b>Concentración madre M (ug/L)</b>	<b>Concentración stock N (mg/L)</b>
Naftaleno	91-20-3	110110	4404
Acenafteno	83-32-9	218460	8738
Fluoreno	86-73-7	22319	893
Fenantreno	85-01-8	10956	438
Antraceno	120-12-7	11077	443
Fluoranteno	206-44-0	22110	884
Pireno	129-00-0	10912	436
Benz(a)antraceno	56-55-3	11154	446
Criseno	218-01-9	11165	447
Benzo(b)fluoranteno	205-99-2	22319	893
Benzo(k)fluoranteno	207-08-9	11110	444
Benzo[a]pireno	50-32-8	10978	439
Dibenz(a,h)antraceno	53-70-3	22055	882
Benzo(ghi)perileno	191-24-2	21780	871
Indeno(1,2,3-cd)pireno	193-39-5	11088	444

**Tabla 17: Concentración de Estándares de Calibración**

<b>Analito</b>	<b>Sol V ug/L</b>	<b>Sol W ug/L</b>	<b>Sol X ug/L</b>	<b>Sol Y ug/L</b>	<b>Sol Z ug/L</b>	<b>Sol AA ug/L</b>
Naftaleno	1,76	4,40	22,02	44,04	88,09	176,18
Acenafteno	1,75	4,37	21,85	43,69	87,38	174,77
Fluoreno	0,36	0,89	4,46	8,93	17,86	35,71
Fenantreno	0,18	0,44	2,19	4,38	8,76	17,53
Antraceno	0,18	0,44	2,22	4,43	8,86	17,72
Fluoranteno	0,35	0,88	4,42	8,84	17,69	35,38
Pireno	0,17	0,44	2,18	4,36	8,73	17,46
Benz(a)antraceno	0,18	0,45	2,23	4,46	8,92	17,85
Criseno	0,18	0,45	2,23	4,47	8,93	17,86
Benzo(b)fluoranteno	0,36	0,89	4,46	8,93	17,86	35,71
Benzo(k)fluoranteno	0,18	0,44	2,22	4,44	8,89	17,78
Benzo[a]pireno	0,18	0,44	2,20	4,39	8,78	17,56
Dibenz(a,h)antraceno	0,35	0,88	4,41	8,82	17,64	35,29
Benzo(ghi)perileno	0,35	0,87	4,36	8,71	17,42	34,85
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,18	0,44	2,22	4,44	8,87	17,74

**Tabla 18: Concentración Estándares de Verificación de la calibración**

<b>Analito</b>	<b>Std0 (ug/l)</b>	<b>St D (ug/l)</b>	<b>St E (ug/l)</b>	<b>St F (ug/l)</b>	<b>St A (ug/l)</b>	<b>St B (ug/l)</b>	<b>St C (ug/l)</b>
Naftaleno	215352	4.31	21.5	103.4	430.7	861.4	2584
Acenafteno	216216	4.32	21.6	103.8	432.4	864.9	2595
Fluoreno	21643	0.43	2.16	10.4	43.3	86.6	259.7
Fenantreno	10843	0.22	1.08	5.20	21.7	43.4	130.1
Antraceno	10800	0.22	1.08	5.18	21.6	43.2	129.6
Fluoranteno	540	0.01	0.05	0.26	1.08	2.16	6.48
Pireno	10886	0.22	1.09	5.23	21.8	43.5	130.6
Benz(a)antraceno	216	0.004	0.022	0.10	0.43	0.86	2.59
Criseno	10800	0.22	1.08	5.18	21.6	43.2	129.6
Benzo(b)fluoranteno	216	0.004	0.022	0.10	0.43	0.86	2.59
Benzo(k)fluoranteno	216	0.004	0.022	0.10	0.43	0.86	2.59
Benzo[a]pireno	1080	0.02	0.11	0.52	2.16	4.32	13.0
Dibenz(a,h)antraceno	2160	0.04	0.22	1.04	4.32	8.64	25.9
Benzo(ghi)perileno	1080	0.02	0.11	0.52	2.16	4.32	13.0
Indeno(1,2,3-cd)pireno	2160	0.04	0.22	1.04	4.32	8.64	25.9

**Tabla 19: Concentración de las soluciones de fortificación**

<b>Analito</b>	<b>SK1(ug/L)</b>	<b>SK2(ug/L)</b>
Naftaleno	44044	1761.8
Acenafteno	43692	1747.7
Fluoreno	8928	357.1
Fenantreno	4382	175.3
Antraceno	4431	177.2
Fluoranteno	8844	353.8
Pireno	4365	174.6
Benz(a)antraceno	4462	178.5
Criseno	4466	178.6
Benzo(b)fluoranteno	8928	357.1
Benzo(k)fluoranteno	4444	177.8
Benzo[a]pireno	4391	175.6
Dibenz(a,h)antraceno	8822	352.9
Benzo(ghi)perileno	8712	348.5
Indeno(1,2,3-cd)pireno	4435	177.4

**Tabla 20: Concentración de las muestras fortificadas**

Analito	Nivel bajo	Nivel	Asequality	Nivel Alto
	Limite Min ug/L	Medio Bajo ug/L	Nivel medio ug/L	Limite Máx ug/L
Naftaleno	6,58	23,49	84,35	1835,2
Acenafteno	6,52	23,30	18,63	1820,5
Fluoreno	1,33	4,76	19,89	372,0
Fenantreno	0,65	2,34	29,00	182,6
Antraceno	0,66	2,36	49,35	184,6
Fluoranteno	1,32	4,72	132,60	368,5
Pireno	0,65	2,33	103,70	181,9
Benz(a)antraceno	0,67	2,38	54,46	185,9
Criseno	0,67	2,38	72,55	186,1
Benzo(b)fluoranteno	1,33	4,76	31,35	372,0
Benzo(k)fluoranteno	0,66	2,37	50,86	185,2
Benzo[a]pireno	0,66	2,34	46,45	183,0
Dibenz(a,h)antraceno	1,32	4,71	72,40	367,6
Benzo(ghi)perileno	1,30	4,65	60,65	363,0
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,66	2,37	82,25	184,8

**Tabla 21: Test de recuperación SALLE en muestra fortificada con HAPs**

Recuperación %	Spike	Con Acetato de Sodio		Sin Acetato de Sodio	
		Solo tubo1	Con dSPE	Solo tubo1	Con dSPE
Analito	Agua ug/L				
Naftaleno	6,46	94%	102%	85%	99%
Acenafteno	6,41	94%	102%	85%	96%
Fluoreno	1,31	97%	103%	86%	96%
Fenantreno	0,64	95%	102%	87%	101%
Antraceno	0,65	93%	100%	86%	99%
Fluoranteno	1,30	91%	101%	83%	100%
Pireno	0,64	95%	102%	85%	100%
Benz(a)antraceno	0,65	90%	97%	82%	95%
Criseno	0,66	91%	100%	84%	98%
Benzo(b)fluoranteno	1,31	93%	100%	85%	99%
Benzo(k)fluoranteno	0,65	92%	100%	84%	97%
Benzo[a]pireno	0,64	91%	98%	84%	96%
Dibenz(a,h)antraceno	1,29	90%	97%	81%	94%
Benzo(ghi)perileno	1,28	91%	97%	83%	96%
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,65	80%	84%	76%	106%

**Tabla 22: Datos de Validación e incertidumbre Naftaleno**

<b>1 Naftaleno Función Respuesta Instrumental</b>				
m		8557608		
Sm		30096		
b		964859		
Sb		744436		
Coeficiente de correlación lineal R2		0,999975		
Limite de detección calculado Curva / Método		0,87	0,436	
Límite de cuantificación experimental		6,58	ppb	
<b>Niveles de validación</b>				
Intervalo de trabajo validado:		6,58	1836	
Nivel ug/l	Repetib.	Reproduc.	Exactitud	%U (k=2)
	%Sr	%SR	%Recup	
6,58	2,97	4,65	81,8	12,57%
23,47	5,87	7,97	63,2	12,28%
84,35	4,22	4,22	114,5	14,46%
1836,6	7,65	7,65	73,6	13,39%

**Tabla 23: Datos de Validación e incertidumbre Acenafteno**

<b>3 Acenafteno Función Respuesta Instrumental</b>				
m		10710412		
Sm		33465		
b		2761172		
Sb		821152		
Coeficiente de correlación lineal R2		0,999980		
Limite de detección calculado Curva / Método		0,77	0,040	
Límite de cuantificación experimental		6,53	ppb	
<b>Niveles de validación</b>				
Intervalo de trabajo validado:		6,53	1822,0	
Nivel ug/l	Repetib.	Reproduc.	Exactitud	%U (k=2)
	%Sr	%SR	%Recup	
6,53	2,28	3,90	88,4	11,88%
23,28	4,24	4,24	76,2	11,43%
18,63	4,85	6,63	98,3	23,06%
1822,0	7,40	7,40	76,7	14,92%

**Tabla 24: Datos de Validación e incertidumbre Fluoreno**

<b>4 Fluoreno Función Respuesta Instrumental</b>				
m		47697756		
Sm		158936		
b		659251		
Sb		796870		
Coeficiente de correlación lineal R2		0,999978		
Limite de detección calculado Curva / Método		0,17	0,033	
Límite de cuantificación experimental		1,33	ppb	
<b>Niveles de validación</b>				
Intervalo de trabajo validado:		1,33	372,3	
Nivel ug/l	Repetib.	Reproduc.	Exactitud	%U (k=2)
	%Sr	%SR	%Recup	
1,33	1,99	3,51	89,3	12,16%
4,76	4,73	4,73	79,0	12,90%
19,89	4,68	4,68	87,5	14,50%
372,3	7,34	7,34	77,4	15,67%

**Tabla 25: Datos de Validación e incertidumbre Fenantreno**

<b>5 Fenantreno Función Respuesta Instrumental</b>				
m		29636496		
Sm		97911		
b		-462635		
Sb		988991		
Coeficiente de correlación lineal R2		0,999978		
Limite de detección calculado Curva / Método		0,33	0,182	
Límite de cuantificación experimental		0,65	ppb	
<b>Niveles de validación</b>				
Intervalo de trabajo validado:		0,65	182,7	
Nivel ug/l	Repetib.	Reproduc.	Exactitud	%U (k=2)
	%Sr	%SR	%Recup	
0,65	2,99	3,73	91,1	12,21%
2,33	4,48	4,48	81,6	11,41%
29,00	4,22	4,22	94,7	15,28%
182,7	8,06	8,06	78,4	15,52%

**Tabla 26: Datos de Validación e incertidumbre Antraceno**

<b>6 Antraceno Función Respuesta Instrumental</b>				
m		63865916		
Sm		434169		
b		3342019		
Sb		1973397		
Coeficiente de correlación lineal R2		0,999861		
Limite de detección calculado Curva / Método		0,31	0,008	
Límite de cuantificación experimental		0,66	ppb	
<b>Niveles de validación</b>				
Intervalo de trabajo validado:		0,66	184,8	
Nivel ug/l	Repetib.	Reproduc.	Exactitud	%U (k=2)
	%Sr	%SR	%Recup	
0,66	1,79	2,88	90,9	11,55%
2,36	4,68	4,68	82,1	12,95%
49,35	3,93	4,10	106,8	14,31%
184,8	7,55	7,55	78,2	15,93%

**Tabla 27: Datos de Validación e incertidumbre Fluoranteno**

<b>7 Fluoranteno Función Respuesta Instrumental</b>				
m		4845325		
Sm		13828		
b		395844		
Sb		252168		
Coeficiente de correlación lineal R2		0,999976		
Limite de detección calculado Curva / Método		0,52	0,021	
Límite de cuantificación experimental		1,32	ppb	
<b>Niveles de validación</b>				
Intervalo de trabajo validado:		1,32	368,8	
Nivel ug/l	Repetib.	Reproduc.	Exactitud	%U (k=2)
	%Sr	%SR	%Recup	
1,32	2,14	3,66	83,2	15,45%
4,71	4,60	4,60	75,2	9,31%
132,60	3,83	3,99	91,4	10,85%
368,8	8,17	8,17	71,9	15,57%

**Tabla 28: Datos de Validación e incertidumbre Pireno**

<b>8 Pireno Función Respuesta Instrumental</b>				
m		37573726		
Sm		100268		
b		1027791		
Sb		823851		
Coeficiente de correlación lineal R2		0,999972		
Limite de detección calculado Curva / Método		0,22	0,081	
Límite de cuantificación experimental		0,65	ppb	
<b>Niveles de validación</b>				
Intervalo de trabajo validado:		0,65	182,0	
Nivel ug/l	Repetib.	Reproduc.	Exactitud	%U (k=2)
	%Sr	%SR	%Recup	
0,65	2,16	3,93	89,1	12,12%
2,33	4,63	4,70	80,9	12,03%
103,70	3,67	5,82	88,7	14,72%
182,0	8,08	8,08	76,2	15,61%

**Tabla 29: Datos de Validación e incertidumbre Benz(a)antraceno**

<b>9 Benz(a)antraceno Función Respuesta Instrumental</b>				
m		44720098		
Sm		216557		
b		1413886		
Sb		991143		
Coeficiente de correlación lineal R2		0,999930		
Limite de detección calculado Curva / Método		0,22	0,013	
Límite de cuantificación experimental		0,67	ppb	
<b>Niveles de validación</b>				
Intervalo de trabajo validado:		0,67	186,1	
Nivel ug/l	Repetib.	Reproduc.	Exactitud	%U (k=2)
	%Sr	%SR	%Recup	
0,67	2,00	6,23	77,4	13,68%
2,38	4,73	4,86	72,3	9,78%
54,46	4,05	6,74	77,6	14,12%
186,1	7,98	7,98	70,0	13,18%

**Tabla 30: Datos de Validación e incertidumbre Criseno**

<b>10 Criseno Función Respuesta Instrumental</b>				
m		44684902		
Sm		215017		
b		1784377		
Sb		1101170		
Coeficiente de correlación lineal R2		0,999954		
Limite de detección calculado Curva / Método		0,25	0,009	
Límite de cuantificación experimental		0,67	ppb	
<b>Niveles de validación</b>				
Intervalo de trabajo validado:		0,67	186,2	
Nivel ug/l	Repetib.	Reproduc.	Exactitud	%U (k=2)
	%Sr	%SR	%Recup	
0,67	1,79	4,26	91,9	12,65%
2,38	4,58	4,58	82,4	12,43%
72,55	3,73	4,79	95,5	11,74%
186,2	7,35	7,35	75,4	15,03%

**Tabla 31: Datos de Validación e incertidumbre Benzo(b)fluoranteno**

<b>11 Benzo(b)fluoranteno Función Respuesta Instrumental</b>				
m		16770122		
Sm		36008		
b		543199		
Sb		605139		
Coeficiente de correlación lineal R2		0,999982		
Limite de detección calculado Curva / Método		0,36	0,005	
Límite de cuantificación experimental		1,33	ppb	
<b>Niveles de validación</b>				
Intervalo de trabajo validado:		1,33	372,3	
Nivel ug/l	Repetib.	Reproduc.	Exactitud	%U (k=2)
	%Sr	%SR	%Recup	
1,33	1,90	3,46	90,2	12,02%
4,76	4,57	4,57	80,8	12,10%
31,35	3,71	4,37	100,9	11,42%
372,3	7,03	7,03	72,3	14,14%

**Tabla 32: Datos de Validación e incertidumbre Benzo(k)fluoranteno**

<b>12 Benzo(k)fluoranteno Función Respuesta Instrumental</b>				
m		57235583		
Sm		252147		
b		1972729		
Sb		1149480		
Coeficiente de correlación lineal R2		0,999942		
Limite de detección calculado Curva / Método		0,20	0,001	
Límite de cuantificación experimental		0,66	ppb	
<b>Niveles de validación</b>				
Intervalo de trabajo validado:		0,66	185,3	
Nivel ug/l	Repetib.	Reproduc.	Exactitud	%U (k=2)
	%Sr	%SR	%Recup	
0,66	1,83	4,36	86,6	12,25%
2,37	4,25	4,25	79,0	11,59%
50,86	3,23	4,98	84,1	13,05%
185,3	7,33	7,33	70,7	12,49%

**Tabla 33 Datos de Validación e incertidumbre Benzo[a]pireno**

<b>13 Benzo[a]pireno Función Respuesta Instrumental</b>				
m		54546219		
Sm		279254		
b		1923890		
Sb		1257932		
Coeficiente de correlación lineal R2		0,999921		
Limite de detección calculado Curva / Método		0,23	0,002	
Límite de cuantificación experimental		0,66	ppb	
<b>Niveles de validación</b>				
Intervalo de trabajo validado:		0,66	183,1	
Nivel ug/l	Repetib.	Reproduc.	Exactitud	%U (k=2)
	%Sr	%SR	%Recup	
0,66	1,66	3,65	87,7	12,02%
2,34	4,31	4,31	81,6	12,48%
46,45	3,14	5,46	93,4	15,60%
183,1	6,59	6,59	70,2	11,82%

**Tabla 34: Datos de Validación e incertidumbre Dibenz(a,h)antraceno**

<b>14 Dibenz(a,h)antraceno Función Respuesta Instrumental</b>				
m		21625762		
Sm		61831		
b		114555		
Sb		1026818		
Coeficiente de correlación lineal R2		0,999967		
Limite de detección calculado Curva / Método		0,47	0,005	
Límite de cuantificación experimental		1,32	ppb	
<b>Niveles de validación</b>				
Intervalo de trabajo validado:		1,32	367,9	
Nivel ug/l	Repetib.	Reproduc.	Exactitud	%U (k=2)
	%Sr	%SR	%Recup	
1,32	1,57	8,05	76,2	15,66%
4,70	5,21	6,06	73,5	13,26%
72,40	3,41	9,60	71,8	17,07%
367,9	7,36	7,36	65,6	11,94%

**Tabla 35: Datos de Validación e incertidumbre Benzo(ghi)perileno**

<b>15 Benzo(ghi)perileno Función Respuesta Instrumental</b>				
m		28223454		
Sm		60170		
b		476563		
Sb		986782		
Coeficiente de correlación lineal R2		0,999982		
Limite de detección calculado Curva / Método		0,35	0,004	
Límite de cuantificación experimental		1,30	ppb	
<b>Niveles de validación</b>				
Intervalo de trabajo validado:		1,30	363,3	
Nivel ug/l	Repetib.	Reproduc.	Exactitud	%U (k=2)
	%Sr	%SR	%Recup	
1,30	1,53	5,48	82,0	13,16%
4,64	4,55	4,76	77,6	11,92%
60,66	2,82	8,15	71,1	16,49%
363,3	6,87	6,87	62,5	11,04%

**Tabla 36: Datos de Validación e incertidumbre Indeno(1,2,3-cd)pireno**

<b>16 Indeno(1,2,3-cd)pireno Función Respuesta Instrumental</b>				
m		2235424		
Sm		28333		
b		-207931		
Sb		289643		
Coeficiente de correlación lineal R2		0,999679		
Limite de detección calculado Curva / Método		1,30	0,047	
Límite de cuantificación experimental		0,66	ppb	
<b>Niveles de validación</b>				
Intervalo de trabajo validado:		0,66	184,9	
Nivel ug/l	Repetib.	Reproduc.	Exactitud	%U (k=2)
	%Sr	%SR	%Recup	
0,66	3,51	3,51	80,0	17,13%
2,36	5,40	6,22	74,3	14,69%
82,25	2,76	7,31	83,1	14,24%
184,9	5,09	5,09	60,7	13,17%

**Tabla 37: Pendientes estándares de Calibración y Verificación**

Num	Analito	Pendiente Verificación abdcef	Pendiente Calibración vwxyzaa	% Error
1	Naftaleno	8027069	8557608	6,2%
3	Acenafteno	10549252	10710412	1,5%
4	Fluoreno	49358395	47697756	-3,5%
5	Fenantreno	27290873	29636496	7,9%
6	Antraceno	73860969	63865916	-15,7%
7	Fluoranteno	4785616	4845325	1,2%
8	Pireno	37179894	37573726	1,0%
9	Benz(a)antraceno	42404279	44720098	5,2%
10	Criseno	43074060	44684902	3,6%
11	Benzo(b)fluoranteno	15966234	16770122	4,8%
12	Benzo(k)fluoranteno	55804483	57235583	2,5%
13	Benzo[a]pireno	54455128	54546219	0,2%
14	Dibenz(a,h)antraceno	20850458	21625762	3,6%
15	Benzo(ghi)perileno	26142220	28223454	7,4%
16	Indeno(1,2,3-cd)pireno	2147712	2235424	3,9%

**Tabla 38: Resumen de recuperaciones obtenidas en la verificación**

	Factor a Exactitud NELAC	Agua de Consumo	Agua Natural	MRC Asequality	Agua descarga
Naftaleno	67,5%	81,8%	63,2%	114,5%	73,6%
Acenafteno	77,5%	88,4%	76,2%	98,3%	76,7%
Fluoreno	76,2%	89,3%	79,0%	87,5%	77,4%
Fenantreno	80,0%	91,1%	81,6%	94,7%	78,4%
Antraceno	79,9%	90,9%	82,1%	106,8%	78,2%
Fluoranteno	80,9%	83,2%	75,2%	91,4%	71,9%
Pireno	84,8%	89,1%	80,9%	88,7%	76,2%
Benz(a)antraceno	83,8%	77,4%	72,3%	77,6%	70,0%
Criseno	81,8%	91,9%	82,4%	95,5%	75,4%
Benzo(b)fluoranteno	83,3%	90,2%	80,8%	100,9%	72,3%
Benzo(k)fluoranteno	82,2%	86,6%	79,0%	84,1%	70,7%
Benzo[a]pireno	82,1%	87,7%	81,6%	93,4%	70,2%
Dibenz(a,h)antraceno	80,8%	76,2%	73,5%	71,8%	65,6%
Benzo(ghi)perileno	82,6%	82,0%	77,6%	71,1%	62,5%
Indeno(1,2,3-cd)pireno	71,2%	80,0%	74,3%	83,1%	60,7%

**Tabla 39: Resumen de Incertidumbre obtenidas en la verificación**

	% S objetivo Anexo3	Agua de Consumo	Agua Natural	MRC Asequality	Agua descarga
Naftaleno	22,0%	12,6%	12,3%	14,5%	13,4%
Acenafteno	18,2%	11,9%	11,4%	23,1%	14,9%
Fluoreno	17,6%	12,2%	12,9%	14,5%	15,7%
Fenantreno	15,8%	12,2%	11,4%	15,3%	15,5%
Antraceno	16,3%	11,6%	13,0%	14,3%	15,9%
Fluoranteno	15,4%	15,5%	9,3%	10,9%	15,6%
Pireno	17,5%	12,1%	12,0%	14,7%	15,6%
Benz(a)antraceno	14,8%	13,7%	9,8%	14,1%	13,2%
Criseno	16,3%	12,7%	12,4%	11,7%	15,0%
Benzo(b)fluoranteno	18,2%	12,0%	12,1%	11,4%	14,1%
Benzo(k)fluoranteno	23,9%	12,3%	11,6%	13,1%	12,5%
Benzo[a]pireno	19,1%	12,0%	12,5%	15,6%	11,8%
Dibenz(a,h)antraceno	19,2%	15,7%	13,3%	17,1%	11,9%
Benzo(ghi)perileno	18,4%	13,2%	11,9%	16,5%	11,0%
Indeno(1,2,3-cd)pireno	20,6%	17,1%	14,7%	14,2%	13,2%


## ANEXOS

### INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1	CERTIFICADO DE ANÁLISIS M8310-QC-ATI.....	105
ANEXO 2	CERTIFICADO DE ANÁLISIS M-PAH5504A99-5ML.....	106
ANEXO 3	INFORME DE PT ASEQUALITY .....	107
ANEXO 4	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS USADOS EN VERIFICACIÓN EXPERIMENTAL .	108
ANEXO 5	PREPARACIÓN DE PATRONES DE REFERENCIA.....	110
ANEXO 6	PREPARACIÓN MUESTRAS DE REFERENCIA .....	113
ANEXO 6	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN .....	114





## ANEXO 1 Certificado de Análisis M8310-QC-ATI

125 Market Street New Haven, CT 06513 USA	 <b>AccuStandard® Inc.</b>	Tel (203)786-5290 Fax (203)786-5287 www.AccuStandard.com
---	---	--

## CERTIFICATE OF ANALYSIS


<b>Catalog No:</b> M-8310-QC-ATI <b>Description:</b> PAH Mix <b>Lot:</b> 214111056 <b>Solvent:</b> Acetonitrile <b>Hazards:</b> <b>HIGHLY FLAMMABLE</b> - Refer to SDS for safety info	<b>Date Certified:</b> Nov 13, 2014 <b>Expiration:</b> Nov 13, 2017 <b>Sample Size:</b> 1 mL <b>Components:</b> 18 <b>Storage Condition:</b> Ambient (>5 °C)/Sonicate Included on ISO/IEC 17025 Scope of Accreditation: Yes Included on ISO Guide 34 Scope of Accreditation: Yes
--	--

**Danger 2**

Component	CAS #	Purity % (GC/MS)	Prepared Concentration* (µg/mL)	Certified Analyte Concentration* (µg/mL)
Acenaphthene	83-32-9	99.3	1000	993
Acenaphthylene	208-96-8	99.1	2004	1986
Anthracene	120-12-7	97.7	103.1*	100.7
Benz(a)anthracene	56-55-3	100.0	101.4	101.4
Benzo(a)pyrene	50-32-8	99.8	100.0	99.8
Benzo(b)fluoranthene	205-99-2	100.0	202.9	202.9
Benzo(k)fluoranthene	207-08-9	100.0	101.0	101.0
Benzo(g,h,i)perylene	191-24-2	98.9	200.2	198.0
Chrysene	218-01-9	99.8	101.7	101.5
Dibenz(a,h)anthracene	53-70-3	99.0	202.5	200.5
Fluoranthene	206-44-0	97.2	206.8*	201.0
Fluorene	86-73-7	100.0	202.9	202.9
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	193-39-5	99.2	101.6	100.8
Naphthalene	91-20-3	99.8	1003	1001
Phenanthrene	85-01-8	99.5	100.1	99.6
Pyrene	129-00-0	98.1	101.1	99.2
1-Methylnaphthalene	90-12-0	98.5	1010	995
2-Methylnaphthalene	91-57-6	98.4	1004	988

\* Weight compensated to 100% purity.  
 A product with a suffix (-1A, -2B, etc. or -01, -02, etc.) on its lot number has had its expiration date extended and is identical to the same lot number without the suffix.  
 † All weights are traceable through NIST, Test No. 822-275872-11  
 ‡ Certified Analyte Concentration = Purity x Prepared Concentration. The Uncertainty associated with the gravimetric values reported on this certificate is ±0.24%. The CRM Uncertainty calculated for this product is ±5%. These values are the expanded uncertainty and represent an estimated standard deviation equal to the positive square root of the total variation of the uncertainty of components. A normal distribution is assumed and a coverage factor of K=2 is chosen using approximately a 95% confidence level.  
 Labels and certificates follow U.S. Conventions in reporting numerical values:  
 A comma (,) is used to separate units of one-thousand or greater.  
 A period (.) is used as a decimal place marker.  
 See reverse side for additional information

  
 Certified By: \_\_\_\_\_  
 Larry Decker, Organic QC Manager

Page 1 of 1 For use in routine laboratory analysis.

AccuStandard is accredited to ISO Guide 34, ISO/IEC 17025 and certified to ISO 9001

OR-ORIG/NO-001  
Rev. 7/11

## ANEXO 2 Certificado de Análisis M-PAH5504A99-5ML



660 Tower Lane • P.O. Box 599 • West Chester, PA 19381-0599  
 1-800-452-9994 • 1-610-692-3026 • Fax 1-610-692-8729  
[info@chemservice.com](mailto:info@chemservice.com) • [www.chemservice.com](http://www.chemservice.com)

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

## PAH Mixture #4 - 550

CONCENTRATION Varied Concentration in Acetonitrile  
 CATALOG NUMBER M-PAH5504A99-5ML  
 LOT NUMBER 2260600  
 DATE CERTIFIED 12/11/13  
 EXPIRATION DATE 12/31/15  
 STORAGE Room Temperature  
 HANDLING See MSDS.  
 INTENDED USE For laboratory use only.

ID	Analyte	CAS	Weight Analyte (mg)	Lot	Purity	Certified Concentration (ug/mL)
N-10999	Acenaphthene	83-32-9	100.600	00010650	99.50	1001.0
N-11001	Acenaphthylene	208-96-8	109.500	00010792	91.50	1001.9
N-11081	Anthracene	120-12-7	5.030	00005170	99.50	50.0
N-11466	Chrysene	218-01-9	5.030	00012533	99.50	50.0
N-11996	Fluorene	86-73-7	10.160	00010564	98.60	100.2
N-12643	Naphthalene	91-20-3	100.200	00009794	99.50	997.0
N-12855	Phenanthrene	85-01-8	5.080	00009658	98.80	50.2
N-13149	Pyrene	129-00-0	5.120	00008326	98.50	50.4
N-10143	1,2-Benzanthracene	56-55-3	0.101	00010662	99.50	1.0
N-11165	Benzo(b)fluoranthene	205-99-2	0.101	00012436	99.50	1.0
N-11168	Benzo(k)fluoranthene	207-08-9	0.101	1619300	99.50	1.0
N-11994	Fluoranthene	206-44-0	0.255	00009663	98.10	2.5
N-10142	1,12-Benzoperylene	191-24-2	0.506	00004151	99.40	5.0
N-11164	Benzo(a)pyrene	50-32-8	0.502	00012218	99.50	5.0
N-10169	1,2,5,6-Dibenzanthracene	53-70-3	1.017	00010627	98.50	10.0
N-12211	Indeno(1,2,3-C,D)pyrene	193-39-5	1.008	00010725	99.40	10.0
<b>Analytical Test</b>		<b>Value</b>				
CONCENTRATION (HPLC)		VERIFIED				

COA Form  
 Revision 1 (01/2013)



## Instructions for Use:

Shake mixture prior to use. If particles are present, sonicate for homogeneity. If sample is diluted to lower concentrations, Class A volumetric glassware must be used.  
 Minimum Sample Size - 0.2 uL for Direct Injection.

Chem Service Inc. guarantees the expanded uncertainty of the above analytes to be +/- 2.0% of the certified concentrations based on gravimetric preparation. The test results published in this report were obtained using equipment capable of producing results that are traceable to NIST and through NIST to the International System of Units (SI). The reported expanded uncertainty of measurement is stated as the combined standard uncertainty of measurement multiplied by the coverage factor k (k=2) such that the coverage probability corresponds to approximately 95%. For certified reference materials, homogeneity and thermal stability testing are available upon request.

Certified By:

*Mary Beth O'Donnell*

Mary Beth O'Donnell  
 CSM/TC

## ANEXO 3 Informe de PT Asequality

CÓD. LAB.	MATRIZ	PARÁMETRO	UNIDAD	FECHA ANÁLISIS	OBJETO DE ENSAYO	CÓD. MUESTRA	LOTE MUESTRA	MEDIA DEL LAB.	Límite superior de aceptación	Límite inferior de aceptación agua contaminada	VALOR CENTRAL LÍMITES DE ACEPTACIÓN	SOBJETIVO	IZI	EVALUACIÓN	
04	AGUA CONT.	HAP'S ALTO	µg/L	28/03 A 06/04 /2015	Único	1	8152-55	17,49	28,8	8,46	18,6	3,39	0,34	satisfactorio	
								ACENAPHTHENE	53,12	73,5	25,2	49,4	8,05	0,47	satisfactorio
								ANTHRACENE	49,01	78,7	30,2	54,5	8,08	0,67	satisfactorio
								BENZO(A)ANTHRACENE	46,13	73,0	19,9	46,45	8,85	0,04	satisfactorio
								BENZO(A)PYRENE	32,33	48,5	14,7	31,35	5,72	0,17	satisfactorio
								BENZO(B)FLUORANTHENE	45,99	87,4	14,3	50,85	12,18	0,40	satisfactorio
								BENZO(K)FLUORANTHENE	50,01	94,1	27,2	60,65	11,15	0,95	satisfactorio
								BENZO(G,I,L)PERYLENE	69,55	108	37,1	72,55	11,82	0,25	satisfactorio
								CHRYSENE	63,83	114	30,8	72,40	13,87	0,62	satisfactorio
								DIBENZO(A,H)ANTHRACENE	131,55	194	71,2	133	20,47	0,05	satisfactorio
								FLUORANTHENE	16,24	30,4	9,37	19,89	3,51	1,04	satisfactorio
								FLUORENE	82,51	133	31,5	82,3	16,92	0,02	satisfactorio
								(INDENO(1,2,3-cd)PYRENE	97,83	140	28,7	84,4	18,55	0,73	satisfactorio
								NAPHTHALENE	26,65	42,7	15,3	29,0	4,57	0,51	satisfactorio
								PHENANTHRENE	93,83	158	49,4	104	18,10	0,55	satisfactorio
PYRENE															

## PROGRAMA DE EJERCICIOS INTERLABORATORIOS / AGUAS Y SUELOS

### INFORME PRELIMINAR



### PARÁMETROS FÍSICO - QUÍMICOS EN AGUAS Y SUELOS

Número: EIL/AEQUALITY/AGUAS FÍSICO-QUÍMICOS 17 SUELOS  
(AMBIENTAL) 09

Quito, Abril 2016

## ANEXO 4 Materiales, Equipos y Reactivos usados en verificación experimental

### Equipos

- HPLC Agilent infinity 1260.
  - Bomba cuaternaria G1311B.
  - Sistema de inyección automática ALS G1329B.
  - Compartimento de columna TCD G1316A.
  - Detector de fluorescencia FLD G1321B.
  - Software Agilent OpenLab CDS EZChrom VerA.04.04-B4.1.48.1.
  - Columna Agilent ZORBAX Eclipse PAH C18 4,6 x 50mm 1,8um.
  - Guard Agilent ZORBAX Eclipse PAH 4 Pack 4,6 x 12,5mm, 5um.
- Ultrasonido Brain Bee DUC-3110.
- Centrífuga Gerber K59A.
- Mufla Fisher Furnace 1500.
- Estufa Memmert UNB400.
- Micropipeta 10-100 ul Thermo.
- Micropipeta 10-100 ul Brand.
- Micropipeta 100-1000 ul Brand.
- Balanza Analítica Mettler Toledo AB204-S/FACT CLASIC PLUS.
- Vortex Boeco V1 Plus.

### Materiales

- Material volumétrico clase A.
  - Balones aforados ámbar 5 ml.
  - Balones aforados ámbar 10ml.
  - Balones aforados ámbar 25 ml.
  - Pipeta 5ml.
  - Pipeta 10ml.
  - Pipeta 25ml.
- Dispersive SPE 15 mL, Fatty samples, AOAC marca Agilent Bond Elut.

- *QuEChERS* Extract Tubes, AOAC Method
- PTFE Syringe Filter Millipore 13mm
- Jeringas plásticas 10ml
- Viales 2 ml
- Cápsulas de porcelana
- Tubos plásticos con tapa 50ml
- Tubos de vidrio con tapa 15ml
- Viales de vidrio ámbar 2ml.
- Tapas para viales 2ml PTFE blanco/silicona roja.

### Reactivos

- Acetonitrilo grado HPLC.
- Agua destilada Tipo I.
- Blanco matriz agua de consumo.
- Blanco matriz agua residual.
- Blanco matriz agua natural.
- Sulfato de magnesio (Previamente tratado en la mufla a temperatura mayor a 400°C por al menos 6 horas).
- Acetato de Sodio (Previamente tratado en la estufa a temperatura mayor a 150°C por al menos 6 horas).
- Estándares y soluciones para calibración y fortificación.

### Materiales de Referencia

- Accustandard PAH Mix M-8310-QC-ATI (Estándar de Calibración y fortificación), certificado en **Anexo 1**.
- Chemservice M-PAH5504A99-5ML (Estándar de Verificación de la curva de calibración), certificado en **Anexo 2**.
- Material de referencia certificado proveniente de la ronda de Asequality abril 2016, Informe de intercomparación en **Anexo 3**

## ANEXO 5 Preparación de patrones de referencia

### Soluciones de calibración:

A partir de una ampolla del PAH Mix M-8310-QC-ATI se preparó una solución madre "M" con 1.1 ml del estándar de calibración (ampolla de vidrio), aforado a 10 ml con acetonitrilo. La Solución "Stock N", se preparó a partir de 0,2 ml de la solución madre y aforada a 5 mL con acetonitrilo. La concentración de cada solución está en la **Tabla 16**. De la solución stock se prepararon 6 soluciones de calibración denominadas V, W, X, Y,Z ,AA. Las concentraciones de cada solución están en la **Tabla 17**. Se prepararon de esta manera:

Solución V: 0.010 ml de solución stock N aforada a 25 ml con acetonitrilo.

Solución W: 0.010 ml de solución stock N aforada a 10 ml con acetonitrilo.

Solución X: 0.050 ml de solución stock N aforada a 10 ml con acetonitrilo.

Solución Y (Control): 0.100 ml de solución stock N aforada a 10 ml con acetonitrilo.

Solución Z: 0.200 ml de solución stock aforada a 10 ml con acetonitrilo.

Solución AA: 0.200 ml de solución stock aforada a 5 ml con acetonitrilo.

### Soluciones de verificación de la calibración:

A modo de verificación, la calibración obtenida se trazó una nueva curva partiendo del estándar de verificación de la calibración M-PAH5504A99-5ML, el cual tiene concentraciones individuales diferentes para cada compuesto con relación a los estándares de calibración, es de diferente origen, fabricante, y se cambió el esquema de dilución. La solución madre "Std 0" es la primera dilución de la ampolla, no se prepara solución stock, las 6 soluciones verificación de la calibración denominadas A, B, C, D, E, F, son diluciones sucesivas en grupos de tres. La concentración de cada solución está en la **Tabla 18**, se prepararon de esta manera:

Estándar Std 0: 5.4 ml del M-PAH5504A99-5ML(Estándar de Verificación de la curva de calibración). (Ampolla de vidrio). Aforada a 25 ml con acetonitrilo.

Estándar A: 50 ul de solución St 0, aforada a 25 ml con acetonitrilo.

Estándar B: 100 ul de solución St 0, aforada a 25 ml con acetonitrilo.

Estándar C: 300 ul de solución St 0, aforada a 25 ml con acetonitrilo.

Estándar D: 100 ul de solución A, aforada a 10 ml con acetonitrilo.

Estándar E: 250 ul de solución B, aforada a 10 ml con acetonitrilo.

Estándar F: 400 ul de solución C, aforada a 10 ml con acetonitrilo.

### **Soluciones de fortificación:**

Las pruebas de recuperación en matriz agua, se realizaron por spike de estándares preparados a partir de una ampolla nueva diferente a la utilizada para la calibración de la solución PAH Mix M-8310-QC-ATI. A estas soluciones de fortificación se las denominó SK1 y SK2, las concentraciones de estas soluciones están en la **Tabla 19**. La preparación se realizó de la siguiente manera:

- Estándar de fortificación SK1: 1.1 ml del (Estándar de fortificación) PAH Mix M-8310-QC-ATI. (Ampolla de vidrio), aforada a 25 ml con acetonitrilo.
- Estándar de fortificación SK2: 1 ml de la solución de verificación SK1, aforada a 25 ml con acetonitrilo.

### **Condiciones de almacenamiento:**

Los HAPs pueden sufrir pérdidas en los estándares más diluidos vía degradación de los compuestos debido a reacciones químicas de fotodescomposición, a procesos metabólicos asociados a microorganismos y a reacciones químicas con óxidos de nitrógeno, óxidos de azufre, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ozono y radicales hidroxilo, además de fenómenos de absorción en los envases que los contienen. En algunos casos se dan conjuntamente más de una reacción dependiendo de condicionantes como la temperatura, el pH, ó el oxígeno.

Para el almacenamiento de todas las soluciones patrón se consideraron los criterios de almacenamiento descritos en el (US EPA 8000D, 2014) (APHA, 2012) (US EPA 8310, 1986). Para el manejo de todos los estándares de calibración, verificación, soluciones madres, stock, MRCs, extractos de muestras y otras referencias usadas en la determinación de HAPs se siguieron las siguientes directrices:

Los estándares son preparados en material de vidrio ámbar y almacenados en el refrigerador a temperatura próxima a 4°C.

Los extractos de muestras, fortificaciones u otra referencia, si no pueden ser analizados inmediatamente se pueden guardar en refrigeración igual que los estándares hasta realizar el análisis cromatográfico.

El periodo máximo de guardado en refrigeración para análisis de los extractos de muestras y soluciones diluidas de calibración es de 40 días, las soluciones concentradas estas son primera dilución a partir de las ampollas estas son SK1, M y Std 0 tienen la vigencia del material primario y se evalúa su estado por medio de la respuesta del equipo tal como recomienda la APHA (2012).

De todas las soluciones almacenadas se llevó un control de pesos de los contenedores antes y después de cada uso. De esta manera se puede controlar si han existido pérdidas por evaporación.

## ANEXO 6 Preparación muestras de referencia

Se obtuvieron 3 muestras, una por cada matriz de interés:

La matriz agua de consumo, se obtuvo de la red de suministro de agua potable del laboratorio.

La matriz agua natural se obtuvo del canal de abastecimiento de agua cruda (sin tratamiento) de la planta de tratamiento El Placer.

La matriz agua de descarga, se escogió al azar una muestra de las aguas de descarga que ingresan regularmente al laboratorio, la muestra que fue seleccionada fue de una planta de procesamiento de lácteos.

Las tres muestras fueron captadas el 3 de junio del 2016. A cada una de las muestras se les hicieron ensayos previos para determinar si existía presencia de HAPs, en las mismas. En todas las muestras se obtuvo señales menores a los límites de cuantificación de la curva. Las fortificaciones se las realizó inmediatamente antes de iniciar la extracción y no se almacenaron muestras con fortificaciones. En la **Tabla 20** se observan las concentraciones en matriz de cada una de las fortificaciones y del material de referencia certificado. Las matrices fueron fortificadas de la siguiente manera:

- Nivel Bajo: 93.4ul de SK2 en 25 ml de matriz agua de consumo.
- Nivel Medio-Bajo: 333 ul de SK2 en 25 ml de matriz agua natural.
- Nivel Alto: 417 ul de SK1 en 10 ml de matriz agua residual.
- Nivel Medio-Alto: proveniente de ensayo de interlaboratorio Asequality abril 2016. Se respetó la relación de concentrado/agua declarado en el protocolo del ensayo que era de 1000ul por litro de agua grado reactivo, pero aplicado a un volumen de 10ml, esto es 10ul.

## ANEXO 6 Métodos de extracción

Se preparó con antelación suficiente número de tubos de vidrio con tapa lavados según el acápite de interferencias en cada uno se colocó  $6.0 \pm 0.1$ g del sulfato de magnesio previamente calcinado. Finalmente se definieron los procedimientos de extracción de esta forma:

### Fortificaciones en Rango bajo y medio bajo:

En un tubo plástico con tapa de 50 ml vacío, se colocaron 25 ml de la muestra de agua, y adicionó 5 ml de acetonitrilo.

### Fortificaciones en Rango alto y medio alto

En un tubo plástico de con tapa de 50 ml vacío, se colocó 10 ml de la muestra de agua, medir y adicionar 10 ml de acetonitrilo.

Para ambos procedimiento se continúa de esta forma:Agitación en vortex alternando con agitación manual por 5 minutos y centrifugar 2 minutos (este paso tiene la función de despejar la tapa del tubo de 50 ml de gotas que se hayan quedado después de la agitación, al omitir este paso, suelen caer gotas por las paredes exteriores del tubo; al destaparlo para cargar las sales). Agregar al tubo plástico con la muestra el contenido de los dos (2) tubos de vidrio con las sales pesadas para la relación 25:5 y un (1) tubo para la relación 10:10. Inmediatamente tapar bien el frasco. Agitación en vortex y alternar con agitación manual, tratando de romper el material formado. Esta es una reacción altamente exotérmica se debe mantener los estándares de seguridad. Centrifugar por 5 minutos, transcurrido el tiempo de centrifugación, se sacan suavemente los tubos. La fase de interés en donde se han extraído los HAPs es la superior. Filtrar 2ml del extracto por usando filtros de teflón en una jeringa sin émbolo y recoger en un vial de 2 ml con tapa.

Para las muestras de nivel medio alto y alto, se realizó clean-up de esta manera:Aproximadamente 5 ml del extracto sobrenadante del tubo 1, se transfirieron directamente a un tubo de 15 ml de Dispersive SPE (dSPE) AOAC,

tapar y agitar frasco manualmente y con vortex. Esta es una reacción es débil comparada a la de tubo 1. Centrifugar por alrededor de 5 minutos. Filtrar 2ml del extracto usando filtros de teflón en una jeringa sin émbolo y recoger en un vial de 2 ml con tapa. La concentración de los extractos que excedieron el límite máximo de calibración se les realizó diluciones. Paralelo a las extracciones de las matrices con spike, se hicieron extracciones de la matriz como blancos. Estos blancos se diluyeron de la misma forma que se realizó en la muestra fortificada.

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Byron Acosta Hurtado, con CC 1717254294, autor del trabajo de graduación titulado:

“Aplicación de la Extracción Líquido-Líquido asistida por Saturación Salina para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en matrices acuosas por HPLC-FLD.”, previa la obtención del grado académico de LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS ESPECIALIDAD QUÍMICA ANALÍTICA, en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

- 1- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
- 2- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 20 de diciembre del 2016



Byron Stalin Acosta Hurtado

CC 1717254294