



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN SUELOS Y SEDIMENTOS MEDIANTE EXTRACCIÓN ACELERADA CON SOLVENTE (ASE) Y CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS (GC-MS)”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de:

Químico Ambiental

MARIANA ALEJANDRA MOLINA TAPIA

Director de Seminario de Título: Sr. Mauricio Araya Quijada.

Co-Director Seminario de Título: Qco. Amb. Javier Vera Maldonado.

Profesor Patrocinante: M. Cs. Sylvia Copaja

Agosto 2018

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por Sr(ta):

MARIANA ALEJANDRA MOLINA TAPIA

“DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN SUELOS Y SEDIMENTOS MEDIANTE EXTRACCIÓN ACELERADA CON SOLVENTE (ASE) Y CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS (GC-MS)”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Químico Ambiental

Sr. Mauricio Araya Quijada
Director Seminario de Título

Qco. Amb. Javier Vera Maldonado
CoDirector Seminario de Título

M. Cs. Sylvia Copaja Castillo
Profesor Patrocinante

COMISIÓN DE EVALUACIÓN

Presidente
M. Cs. Inés Ahumada Torres

Corrector
Dra. Isel Cortés Nodarse

Santiago de Chile, Agosto de 2018

RESEÑA



Cursé desde 7° básico a 4° medio en el Liceo N°1 Javiera Carrera, donde me di cuenta que el área científica me llamaba la atención. El electivo de química, matemáticas y la enseñanza de reciclaje que mi familia me entregó desde pequeña, me hizo ver y creer en un mundo con mayor conciencia a nivel ambiental. Cuando terminé la enseñanza media, aun no encontraba la carrera perfecta que mezclara mis ideales y solo sabía que quería estudiar en la universidad. La carrera Química Ambiental de la Universidad de Chile y el campo laboral que esta tiene, me fue generando cada vez más entusiasmo en el área, donde además de ser un químico tradicional, nos capacitan para abordar el problema de la producción desde una perspectiva del cuidado del medio ambiente. Durante mi formación académica, tuve la posibilidad de conocer estas áreas, a través de una práctica en el Departamento de Desarrollo Sostenible en la papelera CMPC Tissue y en el Laboratorio de la Sección Química Ambiental del Instituto de Salud Pública de Chile, donde se desarrolló la presente investigación.

Dedicado a mis padres, mis pilares fundamentales, mis ojos y mi inspiración...
a mis hermanos, por confiar en el conchito del hogar...
y a mi compañero de sueños y sonrisas.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Sección Química Ambiental del Instituto de Salud Pública, por los conocimientos entregados por parte de los profesionales del área y la excelente calidad humana, que en su conjunto permitieron llevar a cabo un trabajo agradable y exitoso.

Se agradece a Mauricio Araya, jefe de Sección Química Ambiental y director de seminario, por su apoyo, consejos y por la confianza e invitación a participar en el XIII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo.

También mis agradecimientos a la profesora patrocinante Sylvia Copaja C., por su excelente voluntad y guía en este proceso, quién también fue mi supervisora durante los días de congreso y me brindó su apoyo en el trabajo presentado.

Especialmente, los agradecimientos se dirigen al Químico Ambiental Javier Vera, quién me invitó y recibió en el laboratorio para desarrollar el seminario y estuvo presente en la totalidad del trabajo con gran amabilidad, paciencia y alegría al ver los logros obtenidos hasta el día de hoy. Gracias a ti Bodoque, gran amigo y excelente Co-Director.

INDICE DE CONTENIDOS

I - INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes Generales.....	1
1.2. El petróleo y sus derivados.....	2
1.2.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos	6
1.3. Contaminación de suelos y sedimentos con hidrocarburos	9
1.3.1. Efecto de los HAPs en las propiedades de los suelos.....	10
1.3.2. Efecto de HAPs en los sedimentos	11
1.3.3. Efecto de HAPs en la salud de los seres humanos	12
1.4. Propiedades de los HAPs que determinan el destino en el ambiente	14
1.5. Método analítico para la determinación de HAPs	17
1.5.1. Extracción Acelerada con Solvente.....	19
1.5.2. Análisis instrumental.....	25
1.5.3. Validación método analítico.....	28
1.6. Objetivos.....	41
1.6.1. Objetivo general	41
1.6.2. Objetivos específicos.....	41
II - MATERIALES Y MÉTODOS	42
2.1. Materiales	42
2.2. Equipos	43
2.3. Reactivos	43
2.3.1. Preparación solución estándar de trabajo (Hidrocarburos aromáticos policíclicos).....	44

2.3.2. Preparación estándar subrogante Naftaleno D8	44
2.3.3. Preparación estándar subrogante Pireno D10.....	44
2.4. Caracterización instrumental de hidrocarburos aromáticos policíclicos ..	45
2.5. Optimización extracción ASE	48
2.5.1. Preparación de la muestra previa a la extracción	48
2.5.2. Parámetros de extracción.....	50
2.5.3. Tratamiento muestra posterior a la extracción	51
2.6. Plan de validación método analítico	53
2.6.1. Selectividad	53
2.6.2. Límites de detección y cuantificación	54
2.6.3. Linealidad y sensibilidad.....	54
2.6.4. Precisión	54
2.6.5. Exactitud.....	55
2.7. Análisis de muestras reales.....	56
III - RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
3.1. Condiciones cromatográficas.....	59
3.2. Efecto matriz en la optimización de HAPs en suelo y sedimento	60
3.3. Efecto de distintos adsorbentes en la extracción ASE.....	62
3.4. Resultados optimización metodología ASE	66
3.4.1. Optimización método Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en suelo	67
3.4.2. Optimización método Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en sedimento	70

3.5. Evaluación parámetros de validación	74
3.5.1. Selectividad	75
3.5.2. Límites	76
3.5.3. Linealidad y sensibilidad.....	79
3.5.4. Precisión	82
3.5.5. Veracidad.....	85
3.5.6. Incertidumbre expandida	89
3.6. Análisis de muestras reales	91
IV - CONCLUSIONES	93
V - RECOMENDACIONES.....	95
VI - REFERENCIAS	96
VII - ANEXOS.....	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructura y números CAS de hidrocarburos aromáticos policíclicos prioritarios (HAPs).	4
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.	16
Tabla 3. Comparación de ASE con otras técnicas de extracción para muestras sólidas.	18
Tabla 4. Criterios de aceptabilidad para la precisión.	35
Tabla 5. Porcentaje de recuperación según AOAC según concentración de analitos.	38
Tabla 6. Condiciones cromatográficas utilizadas en caracterización.	46
Tabla 7. Tiempos de retención, ion cuantitativo y iones verificados (Q1 y Q2) para los 16 hidrocarburos del compuesto HAPs.	47
Tabla 8. Caracterización matrices ambientales suelo y sedimento utilizado para optimización.	48
Tabla 9. Diseños factoriales completos de 2 niveles utilizado para la optimización ASE.	51
Tabla 10. Concentración utilizada para puntos de curva en suelo y sedimento.	54
Tabla 11. Coeficiente de variación de Horwitz dependiendo de la concentración.	55
Tabla 12. Localización geográfica de 10 sitios de muestreo en la Bahía de Quintero.	57
Tabla 13. Parámetros evaluados estadísticamente en la optimización de la extracción de HAPs en suelo.	69
Tabla 14. Parámetros evaluados estadísticamente en la optimización de la extracción de HAPs en sedimentos.	72
Tabla 15. Condiciones de extracción acelerada con solvente optimizadas para HAPs en suelos y sedimentos.	73

Tabla 16. Resultados de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) del método Extracción Acelerada con Solvente y cuantificación por GC-MS de HAPs en suelo.	77
Tabla 17. Resultados de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) del método Extracción Acelerada con Solvente y cuantificación por GC-MS de HAPs en sedimento.	78
Tabla 18. Resultados de la linealidad y sensibilidad del método Extracción Acelerada con Solvente y cuantificación por GC-MS de HAPs en suelo.	80
Tabla 19. Resultados de la linealidad y sensibilidad del método Extracción Acelerada con Solvente y cuantificación por GC-MS de HAPs en sedimento.	81
Tabla 20. Resultados de la precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad del método Extracción Acelerada con Solvente y cuantificación por GC-MS de HAPs en suelo.	83
Tabla 21. Resultados de la precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad del método Extracción Acelerada con Solvente y cuantificación por GC-MS de HAPs en sedimento.	84
Tabla 22. Resultados de la recuperación del método Extracción Acelerada con Solvente y cuantificación por GC-MS de HAPs en suelo.	87
Tabla 23. Resultados de la recuperación del método Extracción Acelerada con Solvente y cuantificación por GC-MS de HAPs en sedimento.	88
Tabla 24. Valores de incertidumbre combinada U_c y expandida de método analítico para determinación de HAPs en suelo y cuantificación mediante GC-MS.	89
Tabla 25. Concentraciones de HAPs encontradas en los sitios de muestreo.	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Extractor Acelerado con Solvente (ASE) 350 Thermo Fisher.	19
Figura 2. Optimización metodología extracción acelerada con solvente (ASE).	20
Figura 3. Comparación en el tiempo de preparación de muestras mediante diferentes técnicas de extracción.	24
Figura 4. Esquema de un cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas.	25
Figura 5. Espectrómetro de masas cuadrupolar.	27
Figura 6. Evaluación de la precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad. ...	34
Figura 7. Esquema de preparación de muestra en celda del equipo ASE.	49
Figura 8. Preparación de muestra previa a la extracción acelerada con solvente. a) Fortificación de muestra.; b) Muestra más tierra de diatomeas luego de ser agitada durante 30 min.; c) Introducción de filtros, adsorbentes y muestra a la celda de extracción ASE.; d) Adsorbente, muestra y filtros ubicados en la celda.; e) Compactación con pistilo.; f) Celdas preparadas para extracción ASE.	50
Figura 9. Equipos utilizados en metodología analítica.	52
Figura 10. Localización geográfica de sitios de muestreo Bahía de Quintero.	57
Figura 11. Caracterización de HAPs en matriz suelo de concentración 625 µg/kg leídos por GC-MS. 1= Nap, 2= Acy, 3=Ace, 4= Flu, 5= Phe, 6= Ant, 7= Flt, 8= Pyr, 9= B[a]A, 10= Chr, 11= B[b]F, 12= B(k)F, 13= B(a)P, 14= I(1,2,3-c,d)P, 15= D[a,h]A, 16= B(g,h,i)P.	59
Figura 12. Caracterización de HAPs en matriz sedimento de concentración 630 µg/kg leídos por GC-MS. 1= Nap, 2= Acy, 3=Ace, 4= Flu, 5= Phe, 6= Ant, 7= Flt, 8= Pyr, 9= B[a]A, 10= Chr, 11= B[b]F, 12= B(k)F, 13= B(a)P, 14= I(1,2,3-c,d)P, 15= D[a,h]A, 16= B(g,h,i)P.	60
Figura 13. Evaluación de la respuesta instrumental para Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. C.M.I: Curva en matriz interna, C.E: Curva externa.	61

Figura 14. Estudio de efecto clean-up (limpieza) en el proceso de extracción. a) Tratamiento de muestra de suelo con presencia de sílica gel. b) Tratamiento de muestra de suelo con ausencia de sílica gel.	62
Figura 15. Comparación cromatograma de muestra extraída con presencia y ausencia de sílica gel.	63
Figura 16. Evaluación de tres adsorbentes diferentes en la etapa de limpieza en el método ASE sobre una muestra de suelo.....	64
Figura 17. Análisis instrumental en la evaluación de diferentes adsorbentes en la etapa de limpieza para el método de extracción.....	64
Figura 18. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para Benzo(a)pireno en suelo.	67
Figura 19. Gráfica de efectos principales para benzo(a)pireno.	68
Figura 20. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para Naftaleno en sedimento.	70
Figura 21. Gráfica de efectos principales para naftaleno.	71
Figura 22. Superposición de cromatogramas analizados mediante GC-MS para muestras de HAPs en matriz suelo versus HAPs en solvente, utilizado para prueba de selectividad.	75

LISTA DE ABREVIATURAS

GC-MS	Cromatografía de gases con detector selectivo de masas
ASE	Extracción Acelerada con Solvente
HTP	Hidrocarburos Totales de Petróleo
HAPs	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
Nap	Naftaleno
Acy	Acenaftileno
Ace	Acenafteno
Flu	Fluoreno
Phe	Fenantreno
Ant	Antraceno
Flt	Fluoranteno
Pyr	Pireno
B[a]A	Benzo[a]antraceno
Chr	Criseno
B[b]F	Benzo[b]fluoranteno
B(k)F	Benzo(k)fluoranteno
B(a)P	Benzo(a)pireno
I(1,2,3-c,d)P	Indeno(1,2,3-c,d)pireno
D[a,h]A	Dibenzo[a,h]antraceno
B(g,h,i)P	Benzo(g,h,i)perileno

RESUMEN

El petróleo y el efecto causado en los ecosistemas ha sido una de las grandes problemáticas ambientales a nivel mundial. La Agencia de Protección ambiental de los Estados Unidos (USEPA) considera los hidrocarburos como contaminantes prioritarios, debido a que los derrames alteran directamente las propiedades físicas, químicas y biológicas en suelos, además de generar consecuencias de tipo económico, social y de salud pública.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son derivados del petróleo y se caracterizan por ser la fracción más tóxica del mismo, por lo tanto, las características que hacen importante su estudio son la bioacumulación en la cadena alimenticia, persistencia y alto potencial tóxico y carcinógeno.

La Sección de Química Ambiental perteneciente al Departamento de Salud Ambiental del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), tiene un rol clave en confirmar o descartar presuntos desastres ambientales, al ser laboratorio de referencia ambiental a nivel nacional. Es por ello que el presente trabajo de seminario de título, busca desarrollar un método analítico que permita la determinación de contaminantes como los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en muestra de suelo y sedimento, con el propósito de ser aplicado frente a eventuales contingencias ambientales en el territorio nacional, proporcionando una base científica en la identificación de situación de riesgo, establecimiento de medidas de control, mitigación o reducción del riesgo.

El estudio técnico para la determinación y cuantificación de los hidrocarburos desde la matriz de estudio, se basó en la técnica de extracción acelerada con solvente (ASE), que permite la extracción de compuestos a partir de matrices sólidas utilizando solventes a alta temperatura y presión; donde se estudió la influencia de cinco parámetros a través de un diseño factorial. La determinación de los compuestos se realizó por cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MS).

Para demostrar que el método optimizado propuesto es adecuado se procedió a validar la metodología, evaluando las propiedades analíticas: selectividad, sensibilidad, linealidad y rango, precisión, exactitud, límite de detección y cuantificación, junto con la estimación de la incertidumbre de los resultados.

Las condiciones óptimas obtenidas para la extracción acelerada con solvente (ASE) para HAPs en suelo fueron: una temperatura de extracción a 100°C, con una razón de solvente acetona-diclorometano (1:1, v/v), utilizando un tiempo de extracción estático de 5 min, tiempo de purga de 160 s y un volumen de enjuague de 60%. La validación se verificó en el rango de trabajo de 50-630 µg/kg con un coeficiente de determinación $r^2 > 0,98$; los límites de detección (LD) fueron de 8,9 – 16,4 µg/kg, mientras que los límites de cuantificación (LC) estuvieron entre 27,3 – 49,9 µg/kg; la precisión completa del método en término de repetibilidad fue menor a un 9,87 % expresada como coeficiente de variación porcentual (CVr%), valor correspondiente a fenantreno; mientras que para reproducibilidad el CVri% fue menor que 11,38, correspondiente a antraceno. Finalmente, la recuperación de HAPs en suelo se encontró entre 93,8-104,4%.

Los resultados de optimización en el extractor acelerado con solvente para HAPs en sedimento fueron: una temperatura de extracción a 150°C, con una mezcla de solventes acetona-diclorometano (1:9, v/v), utilizando un tiempo de extracción estático de 5 min, tiempo de purga de 200 s y obteniendo un volumen de enjuague final de 60%. La validación de la metodología para sedimentos se verificó en un rango de trabajo entre 50 y 630 µg/kg, obteniendo un coeficiente de determinación $r^2 > 0,98$; el límite de detección (LD) estuvo entre 6,9 – 16,3 µg/kg y el de cuantificación (LC) se encontró en valores 20,9 – 49,6 µg/kg; la precisión en términos de repetibilidad expresada como coeficiente de variación porcentual (CVr%) fue menor que 9,77 el cual corresponde al acenaftileno, mientras que para la reproducibilidad el CVri% fue menor que 11,07 y corresponde a dibenzo[a,h]antraceno. Finalmente, la recuperación de HAPs en sedimento se encontró entre 67,9 - 132,7%.

El método analítico implementado, permite una reducción del tiempo total de análisis y consumo de reactivos, se aplicó exitosamente para la cuantificación de HAPs en muestras de sedimento recolectadas en la Bahía de Quintero, en octubre de 2017.

ABSTRACT

The oil and the effect caused in the ecosystems has been one of the great environmental problems worldwide. The Environmental Protection Agency of the United States (USEPA) considers hydrocarbons as priority pollutants, due to spills that directly alter the physical, chemical and biological properties of soils, as well as generating economic, social and public health consequences.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are petroleum derivatives and are characterized by being the most toxic fraction thereof, therefore, the characteristics that make their study important are the bioaccumulation in the food chain, persistence and high toxic and carcinogenic potential.

The Environmental Chemistry Section belonging to the Department of Environmental Health of the Institute of Public Health of Chile (ISP) has a key role in confirming or ruling out presumed environmental disasters, as it is an environmental reference laboratory at the national level. That is why the present title seminar work, seeks to develop an analytical method that allows the determination of contaminants such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil and sediment sample, with the purpose of being applied in the face of eventual environmental contingencies in the national territory, providing a scientific basis in the identification of risk situation, establishment of control measures, mitigation or reduction of risk.

The technical study for the determination and quantification of hydrocarbons from the study matrix was based on the technique of accelerated extraction with solvent (ASE), which allows the extraction of compounds from solid matrices using high temperature and

pressure solvents; we studied the influence of five parameters, through a factorial design. The determination of the compounds was carried out by gas chromatography with selective mass detector (GC-MS) that allowed to separate, identify and quantify the analytes of interest.

To demonstrate that the proposed optimized method is adequate, we proceeded to validate the methodology, evaluating the following analytical parameters: selectivity, sensitivity, linearity and range, precision, accuracy, limit of detection and quantification.

The optimal conditions obtained for accelerated extraction with solvent (ASE) for PAHs in soil were: an extraction temperature at 100°C, with a solvent ratio acetone-dichloromethane (1:1, v/v), using a time of static extraction of 5 min, purge time of 160 s and a rinsing volume of 60%. Validation was verified in the working range of 50-630 µg/kg with a coefficient of determination $r^2 > 0,98$; the limits of detection (LD) were 8,9 – 16,4 µg/kg, while the limits of quantification (LC) were between 27,3 – 49,9 µg/kg; the complete precision of the method in terms of repeatability was less than 9,87% expressed as percentage coefficient of variation (CVr%), value corresponding to phenanthrene; while for reproducibility the CVri% was less than 11,38%, corresponding to anthracene. Finally, the recovery of PAHs is between 93,8 - 104,4%.

The results of optimization in the accelerated solvent extractor for PAHs in sediment were: an extraction temperature at 150°C, with a mixture of acetone-dichloromethane solvents (1:9, v/v), using a static extraction time of 5 min, purge time of 200 s and obtaining a final rinsing volume of 60%. The validation of the sediment

methodology was verified in a working range between 50 and 630 $\mu\text{g}/\text{kg}$, obtaining a coefficient of determination $r^2 > 0,98$; the limit of detection (LD) was between 6,9 – 16,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and that of quantification (LC) was found in values 20,9 – 49,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$; the precision in terms of repeatability expressed as percentage coefficient of variation (CV%) was less than 9,77% which corresponds to acenaphthylene, while for reproducibility the CV% was less than 11,07% and corresponds to dibenzo[a, h]anthracene. Finally, the recovery of PAHs in sediment is between 67,9 - 132,7%.

The analytical method implemented, which allows a reduction of the total time of analysis and consumption of reagents, was applied successfully for the quantification of PAHs in sediment samples collected in the Bay of Quintero, in October of 2017.

I - INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes Generales

El suelo representa un ecosistema donde actualmente se puede encontrar una gran variedad de compuestos tóxicos. Dentro de las actividades que tienen alto potencial de contaminación en suelos se encuentran: industrias extractivas, mineras e hidrocarburos proveniente de las actividades industriales, incluyendo el almacenamiento, transporte y distribución de sustancias peligrosas; la actividad agrícola y forestal, y la disposición final de residuos peligrosos; la actividad petrolera en fase de refinación, así como el almacenamiento, transporte y distribución de combustibles líquidos derivados del petróleo (Arroyave & Restrepo, 2009). Este último contaminante ha cobrado gran importancia en los últimos años a nivel país, ya que gran cantidad de los productos petrolíferos finales contaminan el ambiente terrestre y marino, afectando la diversidad del ecosistema y consecuentemente ocasiona efectos de tipo social, económico y de salud pública (Cavazos-Arroyo y col, 2014).

La contaminación por hidrocarburos en el medio marino produce pérdidas económicas importantes, principalmente por la actividad urbana industrial realizada en la costa, por lo que luego de un derrame de petróleo se interrumpe el sector de la pesca y acuicultura, debido a la toxicidad de los hidrocarburos y la asfixia generada en los animales explotados comercialmente (ITOPF, 2009). Las repercusiones económicas se perciben también en el turismo, ya que se opaca la imagen del sector turístico local,

afectando las actividades costeras tradicionales, comercio, acuarios e instalaciones de recreación que requieren suministro continuo de agua de mar limpia, puertos deportivos y pesqueros, como también en el sector industrial que utiliza el agua de mar en numerosas actividades (The International Tanker Owner Pollution Federation Limited, 2011).

1.2. El petróleo y sus derivados

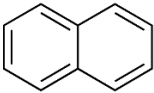
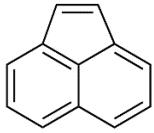
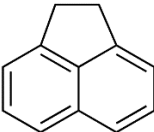
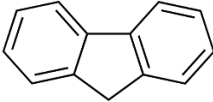
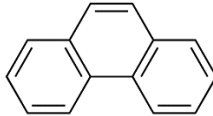
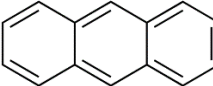
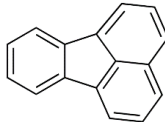
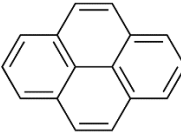
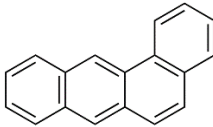
El petróleo es una mezcla compleja de varios compuestos químicos con diferente funcionalidad, constituidos en su mayoría por hidrocarburos (alcanos, cicloalcanos, anillos aromáticos), que representan el 50-98% de la composición total, por lo que el carbono (76-86%) e hidrógeno (10-14%) son los elementos principales y más abundantes del petróleo. En menor proporción contiene azufre (0-10%), nitrógeno (0-1%) y oxígeno (0-5%) (Nelson y col., 2016), y dependiendo del tipo de crudo se encuentran fracciones trazas de metales como: vanadio, níquel, hierro, aluminio y cobre (Toledo Ocampo, 2005).

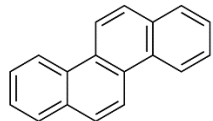
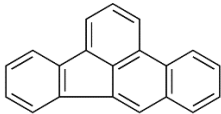
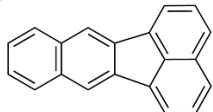
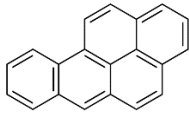
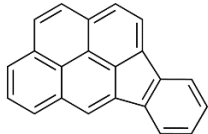
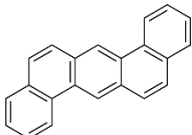
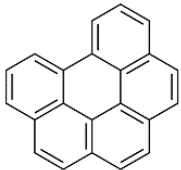
El petróleo en su estado natural se denomina crudo y en su proceso de refinación genera tres fracciones principales: ligeras (gas de refinería, gasolina), medias (queroseno, gasoil) y fracciones (fuel-oil ligero, fuel-oil pesado, asfalto) (Rodríguez-Trigo y col, 2007). Los derivados del petróleo que son más comunes luego de un derrame de hidrocarburos son: gasolina, diésel y combustóleo.

Debido a que los hidrocarburos están representados por muchos compuestos químicos orgánicos, el parámetro analítico de medición se conoce como hidrocarburos totales de petróleo (HTP), que según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) es la medida de una concentración o masa de los constituyentes hidrocarburos de petróleo en una cantidad entregada de suelo o agua. Los HTP representan la sumatoria de los compuestos alifáticos y aromáticos, donde los primeros se componen de cadenas lineales, ramificadas o cíclicas; y los hidrocarburos aromáticos son cíclicos insaturados, dentro de los cuales se encuentran los monoaromáticos (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) y los poliaromáticos (hidrocarburos aromáticos policíclicos, HAP) (Castro Varela, 2007).

Si bien la presencia de estos compuestos en suelos o sedimentos se puede analizar en forma global como HTPs, en este caso se realizará mediante el estudio de sustancias características, es decir, fracciones de HTPs. Específicamente, se estudiarán los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en suelo y sedimentos, debido a la importancia que tienen por su nivel toxicológico (Rubio y col, 2006). A pesar que existen más de 100 clases diferentes de estos contaminantes, se estudiarán solamente 16 HAPs (Tabla 1), debido a que son considerados prioritarios por la USEPA, existe mayor información sobre ellos, son más dañinos, exhiben efectos nocivos representativos de los demás, existe mayor posibilidad de exposición a estos HAPs y presentan una mayor concentración (Agudo, 2009).

Tabla 1. Estructura y números CAS de hidrocarburos aromáticos policíclicos prioritarios (HAPs).

Compuesto	Abreviatura	Número CAS ¹	Estructura
Naftaleno	Nap	91-20-3	
Acenaftileno	Acy	208-96-8	
Acenafteno	Ace	83-32-9	
Fluoreno	Flu	86-73-7	
Fenantreno	Phe	85-01-8	
Antraceno	Ant	120-12-7	
Fluoranteno	Flt	206-44-0	
Pireno	Pyr	129-00-0	
Benzo[a]antraceno	B[a]A	56-55-3	

Criseno	Chr	218-01-9	
Benzo[b]fluoranteno	B[b]F	205-99-2	
Benzo(k)fluoranteno	B(k)F	207-08-9	
Benzo(a)pireno	B(a)P	50-32-8	
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	I(1,2,3-c,d)P	193-39-5	
Dibenzo[a,h]antraceno	D[a,h]A	53-70-3	
Benzo(g,h,i)perileno	B(g,h,i)P	191-24-2	

¹CAS: corresponde a la identificación numérica única para cada compuesto químico que ha sido descrito en la literatura, además de polímeros, secuencias biológicas, preparados y aleaciones.

1.2.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son derivados poliméricos del benceno y están constituidos fundamentalmente por carbono e hidrógeno en su molécula. Los HAPs se clasifican de acuerdo a su masa molar, es decir los compuestos que tienen 2 y 3 anillos bencénicos son de baja masa molar, tienen toxicidad aguda y están asociados con el petróleo y los de alta masa molar, se asocian directamente con la combustión y tienen alto potencial cancerígeno a nivel ambiental (Botello y col, 1995).

El origen de los HAPs puede ser natural o antropogénico, siendo este último la fuente principal de estos contaminantes en el medio marino y terrestre (Soriano-Sanz, 2009).

Las fuentes naturales mayoritarias en el medio marino son:

- HAPs diagénicos, formados por la transformación (reducción) de compuestos orgánicos (quinonas y fenoles) en suelos y sedimentos.
- HAPs biogénicos, biosíntesis directa por plantas, animales marinos y terrestres, incluyendo a la microbiota, bacterias, plancton marino, diatomeas, algas y plantas superiores (Ortíz Brito y col, 2007). Son la fuente de HAPs de 4, 5 y 6 anillos aromáticos, ya que se caracterizan por ser precursores del humus (Ortiz Salinas y col, 2012).
- Incendios forestales, siendo material particulado que llega al mar por deposición atmosférica y por escorrentía superficial.

- HAPs petrogénicos, formados por fugas naturales de petróleo contenidos en los combustibles fósiles (crudo de petróleo, carbón).
- HAPs pirogénicos, formados por la combustión incompleta de todo el material orgánico a elevadas temperaturas (erupciones volcánicas).

Como fuentes antropogénicas, se encuentran:

- Emisión de HAPs de vehículos con motor que usen combustibles fósiles. La temperatura de un motor es suficiente para convertir una fracción del combustible en HAPs vía pirólisis. La combustión de automotores produce hidrocarburos aromáticos policíclicos semejantes a los contenidos en el petróleo crudo (Toledo Ocampo, 2005).
- Plantas de producción de aluminio, siendo un aporte industrial asociado a emisiones y vertidos de HAPs.
- Industria del hierro y acero, asociado a plantas de sintetización, plantas de coque y hornos.
- Plantas de generación de energía (calor, electricidad). Se forman mediante pirólisis por la quema de combustibles fósiles produciendo residuos sólidos, líquidos y gaseosos que son ricos en HAPs, o durante el proceso industrial. Entran al medio acuático y terrestre por deposición atmosférica.
- Incineradoras de residuos industriales y municipales.
- Combustión doméstica.
- Pinturas de barcos, astilleros y estructuras marinas sumergidas.

- Material dragado, donde una extracción de sedimentos contaminados permite la movilización de HAPs a la columna de agua.
- Plataformas petrolíferas en mar abierto.
- Navegación y vertidos accidentales de petróleo.

A pesar de la gran cantidad de fuentes que pueden dar origen a estos contaminantes ambientales, se asume que los HAPs son principalmente pirogénicos y que en el medio marino y costero la actividad antropogénica es responsable de su presencia (Soriano-Sanz, 2009).

La característica que hace importante el estudio de estos contaminantes es su persistencia en suelos y sedimentos, incluyendo procesos de volatilización, foto-oxidación, oxidaciones químicas y bioacumulación. Además, presentar un riesgo ambiental importante debido a su potencial tóxico, carcinógeno y mutagénico hacia mamíferos. Por otro lado, debido a la alta distribución de la materia orgánica y los procesos de combustión que esta genera, los HAPs tienen la característica de ser contaminantes ubicuos, es decir, se encuentran en forma generalizada en todo el medio ambiente, incluyendo aire, suelos, aguas, sedimentos, tejidos biológicos y algunos alimentos (Agudo, 2009).

1.3. Contaminación de suelos y sedimentos con hidrocarburos

Cuando existe un derrame de petróleo en el mar, los hidrocarburos presentan cambios físicos y químicos que determinan su eliminación o su persistencia en la superficie del agua, lo cual dependerá de las propiedades características del tipo de petróleo (gravedad específica o densidad relativa, presión de vapor, viscosidad y punto de fluidez). También dependerá de los procesos que ocurren en conjunto para provocar la meteorización de los hidrocarburos derramados (esparcimiento, evaporación, dispersión, emulsificación, disolución, foto-oxidación, sedimentación y hundimiento, interacción con la costa y biodegradación) (Organización Marítima Internacional, 2005).

La principal problemática asociada a la contaminación por hidrocarburos surge cuando la cantidad de contaminantes presente en una matriz es mayor a la capacidad de degradación por los microorganismos que se encuentran en el medio, que son los responsables de oxidar y mineralizar los HTP a sustancias inocuas. Por tanto, las fracciones de HTP que no sean degradadas se adherirán a las partículas de suelo o sedimentos donde pueden permanecer largos periodos de tiempo (Castro Varela, 2007).

En particular, el fuel-oil pesado es viscoso y tiene baja solubilidad en el agua, lo que causa menos efectos tóxicos y presenta baja disponibilidad ecológica. Por el contrario, los hidrocarburos ligeros debido a la rápida disipación a través de la evaporación y dispersión presentan mayor biodisponibilidad y probabilidad de ocasionar daños por toxicidad.

Los mecanismos que causan daño al medio ambiente son:

- Asfixia con efectos en las funciones fisiológicas.
- Toxicidad química que genere efectos letales y subletales.
- Cambios ecológicos por pérdida de organismos claves y efectos indirectos como pérdidas de especies con importancia ecológica.

1.3.1. Efecto de los HAPs en las propiedades de los suelos

El suelo es un cuerpo natural que conforma el hábitat de bacterias, hongos, levaduras, virus y plantas superiores, entre otros. El suelo y los microorganismos mantienen los sistemas ecológicos, ya que aportan componentes químicos, minerales y complejos orgánicos como ácido húmico, enzimas y vitaminas. El suelo como recurso natural tiene funciones como:

- Medio filtrante durante la recarga de mantos acuíferos.
- Lugar donde se llevan a cabo los ciclos biogeoquímicos, hidrológicos y redes tróficas.
- Lugar donde se realizan actividades agrícolas y ganaderas.
- Soporte de vegetación.

La contaminación por derrame de hidrocarburos afecta las propiedades fisicoquímicas del suelo, así como también las plantas y microorganismos presentes (Ortínez Brito y col, 2007). Las propiedades físicas que se alteran por un derrame de hidrocarburos en el suelo son:

- Modificación estructura del suelo, debido a ruptura de agregados, reduciendo su intercambio de gases con la atmosfera.
- Aumento de la retención de agua en la capa superficial.

Mientras que las propiedades químicas más alteradas son:

- Aumento del carbono orgánico, ya que el 75% del carbono orgánico es oxidable.
- Disminución del pH, debido a la acumulación del carbono orgánico y generación de ácidos orgánicos.
- Disminución de la capacidad de intercambio catiónico, por pérdida de bases y acidificación del suelo.

1.3.2. Efecto de HAPs en los sedimentos

El impacto generado por un derrame de petróleo en el mar es localizado y temporal, debido a que el medio marino se caracteriza por tener una gran capacidad para la recuperación natural. Sin embargo, la persistencia de estos contaminantes puede provocar daños intensos a largo plazo, especialmente cuando quedan retenidos en los sedimentos (ITOPF, 2012). Si bien, no existe un daño directo de HAPs hacia los sedimentos del fondo marino, estos constituyen el más grande y estable depósito de contaminantes orgánicos e inorgánicos, siendo el hábitat, la base alimentaria para muchos organismos que juegan un papel importante en la degradación de la materia orgánica (G.

& Franco, 2016), por lo que la persistencia de HAPs genera efectos nocivos al ecosistema en general y no particular a los sedimentos.

Por otro lado, se conoce que los sedimentos presentan mayores tasas de hidrocarburos que en la columna de agua, por lo que la presencia de estos contaminantes en sedimentos proporcionan un antecedente histórico sobre los niveles de contaminación de un área en particular y pueden utilizarse como indicadores de contaminación por petróleo crudo (Lecaros y col, 1997). Por lo tanto, dependiendo de las características de los hidrocarburos derramados se podrá determinar el alcance de un daño.

1.3.3. Efecto de HAPs en la salud de los seres humanos

La alta distribución de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el medio ambiente y su característica como contaminantes ubicuos, afecta directamente a la salud humana debido a las diferentes vías de exposición hacia el organismo. Existen tres formas principales en que los HAPs ingresan al organismo: vía inhalatoria, a través de la piel y digestiva (Agudo, 2009).

El primer caso, se debe a la presencia de los HAPs en las partículas del aire o polvo (humo de cigarrillo, madera, carbón y áreas industrializadas), los que ingresan directamente a los pulmones. Es importante considerar el daño inmediato generado a las comunidades costeras, ya que un derrame de petróleo crudo volátil causa dificultades respiratorias, dolores de cabeza y náuseas.

El contacto con la piel también es una forma de exposición a estos contaminantes, los cuales en una alta concentración en suelos (sitios de desechos peligrosos, aceite de motor, entre otras) puede generar efectos dañinos en el ser humano.

La vía de exposición digestiva es otra forma en que estos contaminantes pueden introducirse al organismo por ingerir alimentos que contienen HAPs, tales como: vegetales cultivados en suelos contaminados o asar carnes a altas temperaturas. En este sentido, la salud pública se ve afectada directamente puesto que, el ser humano es el componente terminal de varias redes tróficas.

La naturaleza hidrofóbica de los hidrocarburos, es consecuencia de la baja solubilidad que estos contaminantes presentan en ecosistemas marinos y por ende, su bioacumulación en la cadena alimentaria (G. & Franco, 2016), por lo que una vez que ingresan al organismo, la genotoxicidad de los hidrocarburos, deriva en la formación de metabolitos reactivos que se fijan en el ADN, característica que puede causar actividad carcinógena, mutagénica o inmunosupresora. También son sustancias lipófilas, es decir, tienen mayor afinidad por los tejidos ricos en grasas, lo cual aumenta a mayor número de átomos y anillos que forman la molécula de HAPs; y su presencia produce biomagnificación, es decir, se acumulan en los organismos vivos de forma que estos alcanzan concentraciones más elevadas que la concentración del medio (Vives y col., 2001).

Dentro de los efectos de HAPs por exposición a los mismos, se encuentra: toxicidad cardiovascular, efectos negativos sobre la reproducción y médula ósea, supresión del sistema inmune, toxicidad en el hígado y cáncer siendo este último el efecto

tóxico más importante que despierta el interés científico del estudio de HAPs en distintas matrices ambientales (Grey y col, 2016).

1.4. Propiedades de los HAPs que determinan el destino en el ambiente

Como se mencionó anteriormente, los HAPs son contaminantes hidrofóbicos, por lo que están asociados con partículas y coloides en la columna de agua, que floculan y sedimentan hacia la interfase agua-sedimentos, por esta razón se encuentran disponibles para la biota presente, bioacumulados en el tejido lipídico de los organismos.

El destino en el ambiente de HAPs cuando llegan al mar está influenciado por diversos factores como: pH, salinidad, material particulado suspendido, corrientes, mareas; así como también las propiedades químicas propias de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, tales como: presión de vapor, densidad, solubilidad en agua, polaridad, electronegatividad, hidrofobicidad (asociado a la movilidad, estabilidad, acumulación, bioacumulación y sorción química en el ambiente), constante de la Ley de Henry, coeficiente de reparto octanol/agua (K_{ow}) y coeficiente de partición de carbono orgánico (K_{oc}).

El destino de HAPs además de depender de las propiedades del medio afectado y de las propiedades químicas de los hidrocarburos, también depende de otros factores como (Ortíz Brito y col, 2007):

- Cantidad derramada y composición del petróleo.
- Frecuencia y tiempo de exposición.

- Estado físico del derrame.
- Características del sitio donde sucedió el derrame.
- Variables ambientales (temperatura, humedad y oxígeno).
- Sensibilidad de la biota en el ecosistema impactado.

A pesar de la gran cantidad de factores que influyen en el destino de un hidrocarburo, el K_{ow} y el K_{oc} son propiedades importantes que indican la deposición final de los HAPs en el ambiente (Toledo Ocampo, 2005). El K_{ow} representa el reparto de un contaminante entre la fase polar (agua) y la fase no polar (octanol), lo que es característico del reparto entre el agua y el sedimento. Es por esto, que un alto valor de K_{ow} , indica que los compuestos tienden a acumularse en las porciones lipídicas de los organismos y a permanecer en suelos y sedimentos; y un valor bajo explicaría la presencia de estos contaminantes en la columna de agua.

El K_{oc} es un indicador de la tendencia de las sustancias orgánicas a ser absorbidas por la materia orgánica en suelo y los sedimentos, por lo que un alto valor de K_{oc} indica que el hidrocarburo pueda estar en la matriz suelo o sedimento; y un valor bajo de este parámetro, sugiere que el contaminante se encuentre en el cuerpo de agua (Castro Varela, 2007). En la Tabla 2, se observan las propiedades fisicoquímicas de los HAPs, en ella se puede observar que a medida que aumenta su masa molar, disminuye su solubilidad en agua.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Compuesto	Fórmula	Masa molar g/mol	Punto de fusión °C	Punto de Ebullición °C	LogKow
Naftaleno	C ₁₀ H ₈	128.17	80	218	3.30
Acenaftileno	C ₁₂ H ₈	152.19	92-93	280	4.07
Acenafteno	C ₁₂ H ₁₀	154.21	95	278	4.45
Fluoreno	C ₁₃ H ₁₀	166.22	112-116	298	4.18
Fenantreno	C ₁₄ H ₁₀	178.23	97-100	336	4.46
Antraceno	C ₁₄ H ₁₀	178.23	213-217	340	4.65
Fluoranteno	C ₁₆ H ₁₀	202.25	110.8	375	5.22
Pireno	C ₁₆ H ₁₀	202.25	148-150	393	5.43
Benzo[a]antraceno	C ₁₈ H ₁₂	228.29	162	438	5.61
Criseno	C ₁₈ H ₁₂	228.29	254-256	448	5.90
Benzo[b]fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	252.31	168	481	6.12
Benzo(k)fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	252.31	217	480	6.84
Benzo(a)pireno	C ₂₀ H ₁₂	252.31	178.1	496	6.04
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	C ₂₂ H ₁₂	276.33	164	536	6.58
Dibenzo[a,h]antraceno	C ₂₂ H ₁₄	278.35	267	524	6.5
Benzo(g,h,i)perileno	C ₂₂ H ₁₂	276.33	278.3	550	6.7

Las propiedades fisicoquímicas de los HAPs varían principalmente de acuerdo a la masa y la estructura molecular, por lo que al aumentar el peso molecular disminuye la solubilidad acuosa y aumenta la capacidad de estos contaminantes a llegar y adherirse a los sedimentos del fondo marino.

1.5. Método analítico para la determinación de HAPs

Actualmente, existen numerosos métodos analíticos que permiten estimar y cuantificar hidrocarburos. Dentro de estos se puede mencionar, por ejemplo: métodos gravimétricos, absorción de rayos ultravioleta, rayos infrarrojos, cromatografía en fase gaseosa utilizando columnas de capilares de sílice acoplado con detector selectivo de masas y detector de ionización a la llama. Sin embargo, para que la cuantificación final sea eficiente debe ir acompañada de un buen método de extracción.

Existen diversas técnicas de extracción de contaminantes desde matrices sólidas, como son: la extracción Soxhlet (EPA 3540C), la extracción mediante sonicación (EPA 3550B), la extracción con fluidos supercríticos (EPA 3560), extracción asistida por microondas y extracción de fluidos presurizados (EPA 3545A), denominada también extracción acelerada con solvente (ASE). A pesar de que todas las técnicas son metodologías de referencias validadas y que cumplen con la extracción de contaminantes a partir de matrices sólidas, el tiempo invertido en los procesos de extracción, purificación y cuantificación es muy alto con respecto a los tiempos óptimos de respuesta necesarios en un análisis. La extracción acelerada con solvente (ASE), es una técnica moderna y

totalmente automatizada, en la cual se obtienen resultados similares y más eficientes, pero en menor tiempo y consumiendo menos solvente, incrementando la eficiencia del proceso de extracción, en comparación con las demás metodologías (Murphy y col, 2012).

En la Tabla 3, se muestra la comparación (tiempo promedio de extracción, cantidad de solvente, tamaño de muestra) de la extracción acelerada con solvente (ASE) y otras técnicas de extracción para muestras sólidas, así como también las ventajas y desventajas de cada técnica.

Tabla 3. Comparación de ASE con otras técnicas de extracción para muestras sólidas.

Método de extracción	Extracción Soxhlet	Sonicación	Extracción con fluidos supercríticos	Extracción asistida por microonda	Extracción acelerada con solvente (ASE)
Tiempo promedio de extracción	4-48 h	Periodo 3-15 min (Aprox. 3 periodos)	30 min - 2 h	30 min – 1 h	12 – 18 min
Consumo promedio de solvente	150 - 500 mL	100 - 300 mL	8 - 50 mL	10 - 50 mL	15 – 40 mL
Tamaño de muestra	> 10 g	Hasta 5 g	> 1 g	0,2 - 5 g	0,5 – 30 g
Ventajas	Altas recuperaciones en la etapa de extracción	Fácil de usar	Ajuste de parámetros de selectividad	Cortos tiempos de extracción - bajo consumo de solvente	Cortos tiempos de extracción - sistema automatizado - 24 muestras en un ciclo
Desventajas	Alta cantidad de solvente usado - largos tiempos de extracción	No hay posibilidad de automatización - consumo de tiempo en mano de obra	Altos costos	Requiere solventes de altas constantes dieléctricas y filtran la muestra después de la extracción	Altos costos

1.5.1. Extracción Acelerada con Solvente

La extracción acelerada con solventes (ASE) se utiliza para extraer compuestos de interés desde matrices sólidas o semisólidas, utilizando altas presiones y temperaturas, los cuales son parámetros claves que mejoran la cinética del proceso de extracción. Su automatización permite realizar extracciones simultáneamente, además de obtener resultados en cortos periodos de tiempo y utilizar bajas cantidades de solvente, se puede incluir un proceso de clean-up (limpieza) en el mismo proceso de extracción (Figura 1).

La extracción ASE es útil y ha sido altamente efectiva para extraer compuestos orgánicos semivolátiles de matrices ambientales como material particulado, suelo y sedimento.



Figura 1. Extractor Acelerado con Solvente (ASE) 350 Thermo Fisher.

Para lograr una extracción eficiente, se deben seleccionar las técnicas adecuadas de preparación de muestras y los parámetros operativos del equipo. La preparación de muestra es el paso clave en cualquier proceso analítico, el cual suele necesitar demasiadas etapas y horas de trabajo. La capacidad de integrar el pretratamiento, la extracción y la purificación es crítica para una productividad total, para reducir el manejo de muestra y disminuir el tiempo dedicado a la preparación de muestra.

Para llevar a cabo la optimización del método de extracción acelerada con solvente desde una matriz sólida, es necesario realizar dos etapas previas antes de comenzar con la extracción (Richter & Raynie, 2012):

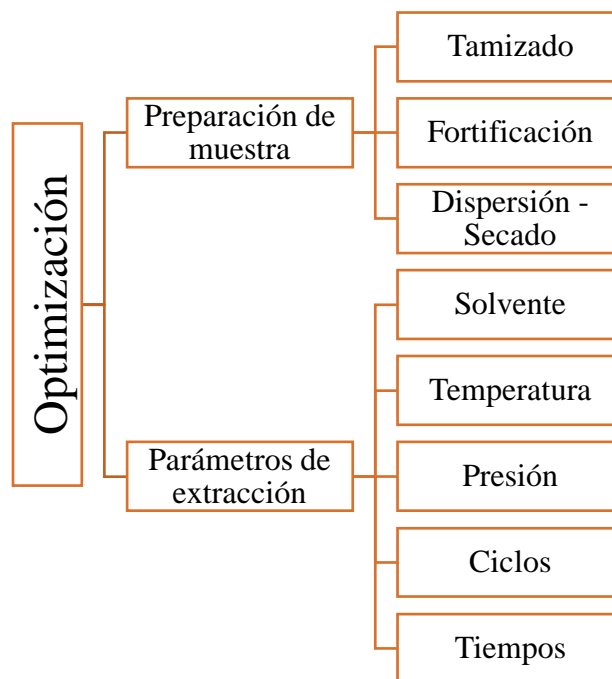


Figura 2. Optimización metodología extracción acelerada con solvente (ASE).

La **preparación de muestra** es la etapa más importante antes de la determinación final de un determinado analito, ya que más de un 60% de los errores producidos en la metodología ocurren en esta fase (Kettle, 2013). Por lo tanto, es de vital importancia la correcta preparación de muestras como primera parte del flujo de trabajo llevado a cabo en el laboratorio. La preparación de la muestra tendrá 3 etapas: tamizado, fortificación y dispersión-secado.

- a) **Tamizado:** Se debe tener un tamaño de partículas de la matriz menor que 1 mm, lo cual permitirá trabajar con una matriz adecuada, logrando mayor área superficial para que el solvente interactúe con los analitos de interés. Este procedimiento permitirá eliminar palos y piedras presentes en la matriz antes de la extracción.
- b) **Fortificación:** Se fortifica la matriz con el contaminante y/o el estándar subrogante para luego agitar con el fin de obtener una mezcla homogénea y representativa de la matriz a estudiar.
- c) **Dispersión-secado:** Debido a que en la celda de extracción puede haber compactación de la matriz sólida por la alta presión y temperatura usada en el sistema ASE, se agrega un agente dispersante directamente a la matriz. En especial, esto ocurre con partículas pequeñas. Se recomienda el uso de tierra de diatomeas como dispersante, la cual cumple la función de agente desecante, ya que absorbe partículas de agua presente en muestras húmedas y ayuda a que sean más fáciles de manejar. En este caso, no es recomendable el secado al horno o la liofilización, debido a que la recuperación de compuestos volátiles

se puede ver comprometida por este tipo de procedimientos, reduciendo la recuperación de los analitos de interés.

Para que ocurra una extracción eficiente, es necesario seleccionar los **parámetros de extracción** que permita la mejor recuperación de analitos desde la matriz, lo cual varía dependiendo del tipo de muestra. Los parámetros que influyen son:

- a) **Solvente:** Es uno de los parámetros más importantes en el sistema ASE. El solvente utilizado debe ser capaz de solubilizar los analitos de interés dejando intacta la matriz. En el caso de muestras húmedas se recomienda utilizar mezcla de solventes polar y no polar. Esto se debe a que las trazas de agua presentes en la matriz pueden impedir que los solventes no polares interactúen con los analitos objetivos, por lo tanto, dicha selección mejorará la eficiencia de extracción.
- b) **Temperatura:** Un aumento de la temperatura, se refleja en la reducción de la viscosidad del solvente; por lo que este parámetro puede ayudar a incrementar la solubilidad de los analitos a partir de una matriz húmeda.
- c) **Tiempo de extracción estático:** Es el tiempo en el cual ocurre una difusión de los analitos retenidos por la matriz al solvente de extracción. Por lo tanto, un mayor o menor tiempo de extracción influye en la recuperación final.
- d) **Volumen de enjuague:** Es la cantidad de solvente utilizado expresado en porcentaje del volumen de la celda.

- e) **Tiempo de purga:** Es el tiempo que la celda se purga con gas nitrógeno, lo cual genera un aumento en la recuperación de los analitos y elimina residuos e interferentes del sistema para una próxima extracción.

Es importante considerar, que la extracción acelerada con solvente tiene baja selectividad, es decir, durante el proceso de extracción ciertos interferentes contenidos en la matriz son co-extraídos juntos con los analitos de interés. Por lo tanto, luego de la extracción se requiere un proceso de limpieza antes de la determinación y cuantificación instrumental (Osman, 2008). Para evitar la limpieza de la matriz post-extracción, esta será incorporada durante el proceso de extracción, para lo cual se agregará un adsorbente sólido directamente a la celda.

Existen diversos adsorbentes sólidos en función de la naturaleza química de las sustancias que se quieren extraer. El uso de Florisil permite la limpieza de extractos que contienen plaguicidas (EPA 3620B), puesto que es un adsorbente más suave que la sílica gel en cuanto a la descomposición de los compuestos. La sílica gel es la forma precipitada del ácido silícico (H_3SiO_3) y permite la limpieza de sustancias no polares como hidrocarburos de petróleo, PCB y HAP (EPA 3630C). La formación de fuertes puentes de hidrógeno entre este adsorbente con los materiales polares de un extracto permite la descomposición de los mismos y el aislamiento de los analitos de interés (Andalucía, 2017).

Si bien el sistema ASE es una técnica automatizada y rápida, para que sea una solución completa en la preparación de muestras en el laboratorio analítico, esta extracción es combinada con el Evaporador Rocket, donde ambas técnicas juntas permiten eliminar por completo el proceso de limpieza y la transferencia de muestra manual, disminuyendo el error aleatorio que permite tener una preparación de muestra precisa y reproducible.

En la Figura 3, se observa la eficiencia de la preparación de muestra utilizando la Extracción Acelerada con Solvente junto con el Evaporador Rocket, con respecto a otras formas de realizar el mismo proceso, considerando que una preparación de muestra tradicional consta de: extracción, limpieza y evaporación.

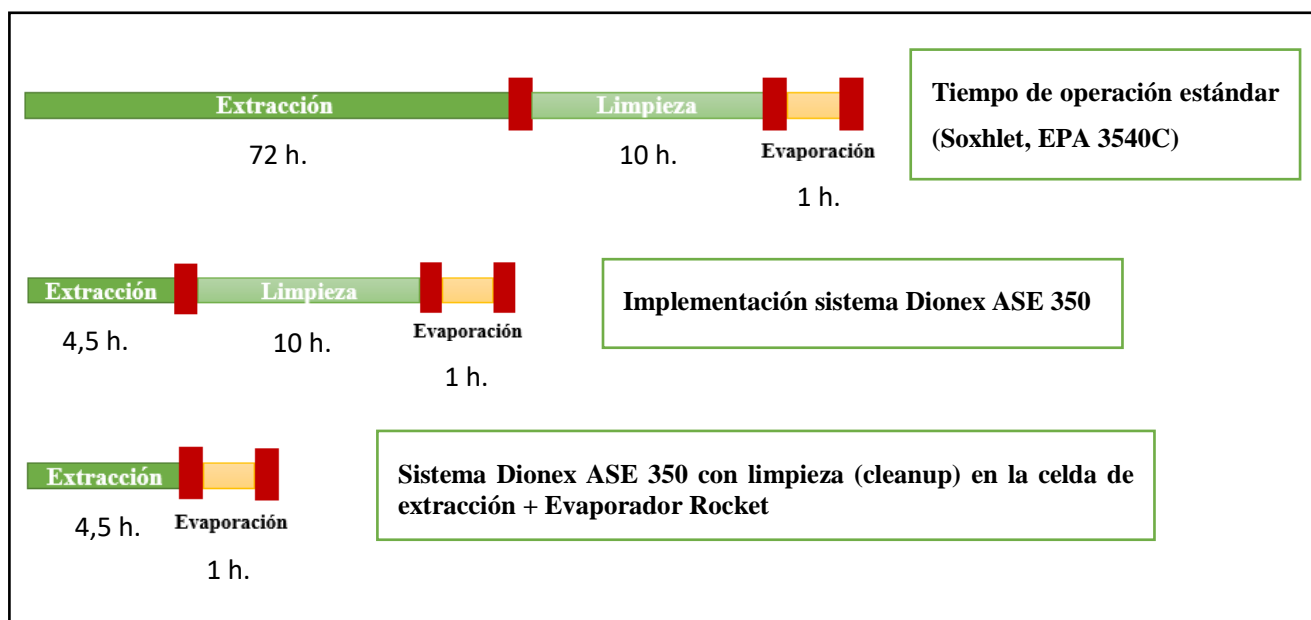


Figura 3. Comparación en el tiempo de preparación de muestras mediante diferentes técnicas de extracción.

1.5.2. Análisis instrumental

La cromatografía de gases es una técnica analítica de alta sensibilidad que permite separar los analitos presentes en muestras complejas. Su acoplamiento con la espectrometría de masas son herramientas fundamentales en los análisis de tipo ambiental, forense, de productos naturales, alimentos, toxicología, entre otros.

En cromatografía de gases (GC), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte, que transporta los analitos a través de la columna hasta llegar al detector. Una vez al interior los componentes de la muestra se convierten en iones gaseosos, los cuales pasarán por un campo magnético que permitirá filtrar las masas, permitiendo separar los diferentes iones en función de su relación carga/masa para ser detectados.

La Figura 4, muestra las etapas del cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas (GC-MS)

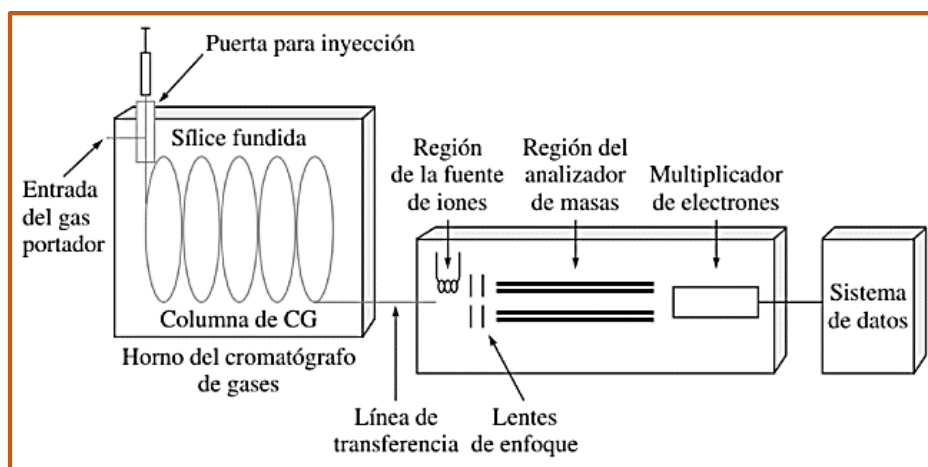


Figura 4. Esquema de un cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas.

El análisis de la muestra por GC-MS consta de las siguientes etapas:

a) Generación de moléculas en fase gaseosa.

Luego que la muestra es introducida en el inyector, ocurre la separación de las moléculas en la columna del cromatógrafo de gases.

b) Ionización por impacto de electrones a partir de moléculas neutras en fase gaseosa

Esta etapa es llevada a cabo en la fuente de iones, donde la molécula se fragmenta y ioniza, a través de impacto o bombardeo electrónico (EI). Los electrones son emitidos por un filamento por efecto termoeléctrico (conversión directa de la diferencia de temperatura a voltaje eléctrico y viceversa), luego son acelerados por diferencia de potencial entre el filamento y la fuente de iones (70 eV), por lo tanto, los electrones adquieren esta energía. El resultado del bombardeo de electrones es un ion radical denominado ion molecular (X^+).

c) Separación en función de relación carga/masa a través de un analizador de masas cuadrupolo.

El haz de iones procedente de la fuente de iones, incide en el centro del cuadrupolo, formado por 4 barras metálicas de sección circular. En el centro se aplica un potencial constante (corriente directa) y un potencial alterno de radiofrecuencia superpuesto, por lo que solamente los iones cuya frecuencia es resonante (coincidente) con la del cuadrupolo, podrán atravesarlo y continuar su trayectoria hasta el detector (iones resonantes). De lo contrario, los iones experimentarán deflexión por el campo. Es por esto, que el cuadrupolo

funciona como un filtro de masas. En la Figura 5, se muestra el funcionamiento del analizador de masas cuadrupolo.

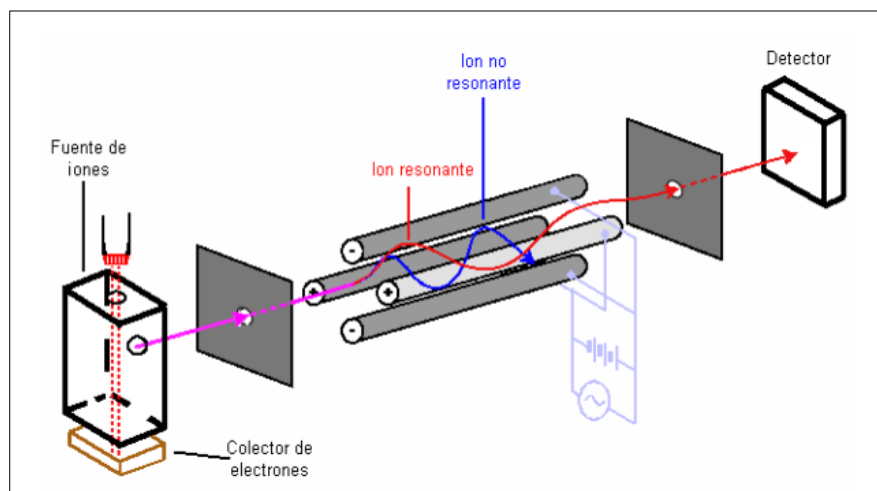


Figura 5. Espectrómetro de masas cuadrupolo.

d) Detección de iones

El electro multiplicador mide la corriente eléctrica con la que provienen los iones al salir del analizador de masas. Dicha corriente es amplificada, digitalizada y convertida en una señal gráfica. La función principal del detector es dar respuesta a los componentes que emergen de la columna. En el caso del detector selectivo de masas, es la corriente iónica total (TIC) procesada en función del tiempo. Este sistema de detección cromatográfica permite elucidar la estructura del analito a través de un espectro de masas.

1.5.3. Validación método analítico

Luego de realizar la optimización analítica del proceso de extracción, se realizó la validación del método analítico. Esta etapa es el criterio final que permitió verificar a través de determinadas propiedades de estadística analíticas que el método fue adecuado para el fin previsto, asegurando la calidad y confiabilidad de los resultados. Si los parámetros cumplen ciertos criterios establecidos, el método es aceptado y puede ser usado para análisis de su competencia (Sandoval, 2010).

Para llevar a cabo la validación del método analítico, se basó en la guía ISO 17.025 la que estipula las siguientes etapas:

- Establecer un plan de validación.
- Desarrollar las pruebas de los parámetros de validación.
- Evaluar resultados de la validación.
- Generar un informe de validación.

Los parámetros de validación que se deben evaluar dependen del tipo de método a validar (normalizado o no normalizado). Los métodos normalizados son aquellos apropiados para un ensayo publicados por organismos de normalización internacional o estipulados por organizaciones comerciales; y los métodos no normalizados son aquellos que son desarrollados por el laboratorio (nuevos). Para este último caso, existen dos tipos de validaciones: retrospectiva, donde la recopilación de información se obtendrá de los datos históricos disponibles; y la validación prospectiva, donde los datos se obtendrán a través de análisis experimentales en el laboratorio (Sandoval, 2010).

Este trabajo corresponde a un método nuevo no normalizado y el tipo de validación es prospectiva, por lo que las propiedades analíticas a evaluar experimentalmente son: selectividad, linealidad, límite de detección y cuantificación, sensibilidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud (veracidad).

1.5.3.1. Selectividad

Corresponde al grado en que un método analítico puede cuantificar un determinado analito en presencia de interferentes, que provienen principalmente por la matriz de estudio, debido a que provee otras sustancias químicas de comportamiento análogo.

1.5.3.2. Linealidad

Es la capacidad que tiene un método de entregar resultados instrumentales dentro de un determinado intervalo proporcionales a la cantidad de analito. Para esto, se debe determinar el rango lineal a través de blancos y patrones de trabajo con valor teórico conocido.

La ecuación de regresión lineal se describe como:

$$y_i = \beta_1 x_i + \beta_0 \quad \text{Ecuación 1}$$

El coeficiente de correlación (r) describe el grado de relación entre la variable x_i (concentración) e γ_i (respuesta). En la práctica, si r es cercano a 1 existe relación entre x_i e γ_i con una elevada probabilidad. En el caso contrario, si r es cercano a cero la correlación disminuye mostrando independencia entre los parámetros. Por lo tanto, el coeficiente de correlación se encuentra entre $-1 < r < 1$, siendo óptimo un valor obtenido de $r \geq 0,99$.

El criterio de aceptación de la linealidad está determinado por el **coeficiente de determinación (r^2)**, el cual debe cumplir que: $r^2 \geq 0,98$.

La evaluación de la curva de calibración global también es un criterio para la determinación de linealidad, la cual se construye con más de una curva con las mismas características, y su evaluación estadística se realiza a través de la prueba *t-student*, mediante la determinación del valor $t_{calculado}$. Se hace una comparación entre el valor de t calculado y valor de t crítico para el nivel de confianza requerido ($\alpha = 0,05$).

El valor de $t_{calculado}$ obtenido a través de datos experimentales se determina a través de:

$$t_{calculado} = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Dónde:

- $|r|$: Valor absoluto del coeficiente de correlación.
- n : Número de grados de libertad.
- r^2 : Coeficiente de determinación.

Se debe cumplir que: $t_{calculado} > t_{critico}$

Por lo tanto, si el $t_{calculado}$ es mayor que el $t_{critico}$, existe una correlación significativa entre las variables x_i e y_i y se rechaza la hipótesis nula H_0 , que establece que no existe una correlación entre ambas variables.

1.5.3.3. Sensibilidad

La sensibilidad corresponde al cociente entre la variación en la respuesta (cambio en la indicación de un sistema de medición) y la variación en la concentración (cantidad de analito en una muestra). Este parámetro está dado por la pendiente en una curva de regresión lineal.

Se determina mediante la ecuación:

$$m = \frac{\sum x_i y_i - \left(\frac{\sum x_i \sum y_i}{n} \right)}{\sum x_i^2 - \left(\frac{(\sum x_i)^2}{n} \right)} \quad \text{Ecuación 3}$$

Dónde:

- x: variable independiente, concentración del analito de interés.
- y: variable dependiente, respuesta instrumental.

Existen dos formas de interpretación de resultados:

- Cuando la pendiente está más inclinada hacia el eje Y, una pequeña variación en la concentración genera grandes cambios en el resultado instrumental.

- Cuando la pendiente está más inclinada hacia el eje X, grandes cambios en la concentración no es significativo en la lectura entregada por el instrumento.

De acuerdo a esto, un método se considera sensible cuando una pequeña variación en la concentración (c), genera grandes cambios en la respuesta entregada instrumentalmente.

1.5.3.4. Límites de detección y cuantificación

Se entiende por **Límite de Detección (LD)** la cantidad mínima de analito en una muestra que se puede examinar y determinar, pero no necesariamente ser cuantificada con un valor exacto, por lo tanto, es un término cualitativo.

$$LD = 3,29 \cdot S_0$$

Siendo S_0 la desviación estándar.

El **límite de cuantificación (LC)** corresponde a la concentración mínima de analito presente en una muestra que se puede determinar bajo las condiciones experimentales descritas en el método y con un nivel aceptable de precisión y exactitud.

$$LC = 10 \cdot S_0$$

La relación de cumplimiento establece que:

$$LD < LC < LMP$$

Siendo LMP el valor máximo permisible.

Además, se deben cumplir que:

- Cuando $LMP \geq 0,1$ ppm:

$$LD < \frac{1}{10}LMP ; LC < \frac{1}{5}LMP$$

- Cuando $LMP < 0,1$ ppm:

$$LD < \frac{1}{5}LMP ; LC < \frac{2}{5}LMP$$

En caso de no existir un valor límite máximo permisible (LMP), se utilizará como criterio la razón de conformidad:

$$4 < \frac{\text{Concentración estándar}}{LD} < 10 \quad \text{Ecuación 4}$$

El criterio será aceptado, si luego de tener el valor de dicha razón, este puede ser detectado dentro del rango o intervalo de trabajo utilizado.

Un valor de razón bajo 4, indica que existe una gran desviación estándar entre las respuestas entregadas instrumentalmente, por lo que es posible que algunos analitos estén bajo el límite de detección. En este caso, se debe aumentar la concentración estándar.

Un valor de razón mayor a 10, es un indicador que existe baja desviación estándar entre las respuestas entregadas por el instrumento, por lo que se estaría trabajando sobre el límite de detección de cada analito.

Un valor de razón entre 4 y 10, indica que las respuestas de todos los analitos entre muestras idénticas son óptimas, debido a que se trabaja sobre el límite de detección de cada uno.

1.5.3.5. Precisión

La precisión establece el grado de concordancia entre los distintos resultados de un ensayo a partir de una muestra homogénea, obtenidos en condiciones establecidas; y depende sólo de la distribución de los errores aleatorios. El grado de precisión se expresa como imprecisión y se determina como la desviación estándar de los resultados obtenidos. La precisión se establece en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

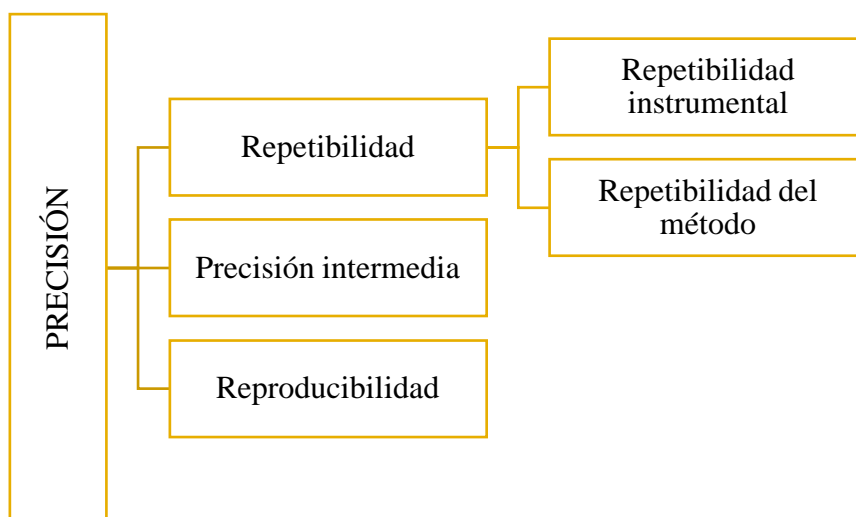


Figura 6. Evaluación de la precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

La **repetibilidad** estudia la variabilidad de los resultados del método en análisis independientes, obtenidos en las mismas condiciones operativas (por un analista, con los mismos aparatos y reactivos) en un mismo laboratorio en cortos intervalos de tiempo.

Se expresa matemáticamente como la **Desviación Estándar relativa** (S_r) y el porcentaje del coeficiente de variación ($CV_r\%$).

La repetibilidad instrumental, representa la variabilidad de los resultados debido a la medición instrumental.

La **reproducibilidad** estudia la variabilidad de los resultados obtenidos bajo diferentes condiciones operativas y en laboratorios distintos. Por lo tanto, puede variar el operador, los equipos o reactivos utilizados. Se determina mediante el porcentaje del coeficiente de variación ($CV_{ri}\%$).

El criterio de aceptabilidad para la precisión está dado por el coeficiente de variación de Horwitz, el cual varía dependiendo de la concentración:

$$CV_h \% = 2^{1-(0,5 \cdot \log C)} \quad \text{Ecuación 5}$$

Dónde c es el valor nominal del analito expresado en potencia de 10.

Los criterios de aceptabilidad para la precisión se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Criterios de aceptabilidad para la precisión.

Prueba	Criterio de aceptabilidad
Repetibilidad	$CV_r \% \leq \frac{CV_r \%_{horwitz}}{2}$
Reproducibilidad Interlaboratorio	$CV_{ri} \% \leq CV_{ri} \%_{horwitz}$
Reproducibilidad intralaboratorio	$CV_{ri} \% \leq \frac{2}{3} CV_{ri} \%_{horwitz}$

1.5.3.6. Exactitud

La exactitud expresa la concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia. Se aplica al conjunto de resultados de un ensayo y supone una combinación entre un componente común de error sistemático o sesgo y componentes aleatorios. Cuando a un método de ensayo se aplica el término exactitud, se refiere a la combinación entre la precisión y veracidad.

La **veracidad** es el grado de concordancia entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y el valor verdadero. Se puede determinar por sesgo (s) o recuperación (R).

- a) **Sesgo (s):** Diferencia entre la expectativa relativa a los resultados de un ensayo y un valor de referencia aceptado. Para esto, se debe medir la diferencia entre la concentración conocida de un analito y la media del valor obtenido. Esto de determina a través de:

$$s = X - X_a \quad \text{Ecuación 6}$$

Dónde:

X : Valor promedio de las lecturas obtenidas.

X_a : Valor asignado, valor certificado del valor de referencia o valor asignado.

La prueba t permite determinar el criterio de aceptación del sesgo (s), mediante:

$$t_{calculado} < t_{critico}$$

Y el $t_{calculado}$ se calcula a través de la ecuación 7:

$$t_{calculado} = \frac{[X_a - X]}{s \cdot \sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 7}$$

El valor $t_{critico}$, se obtiene considerando los grados de libertad $n - 1$, valor de $\alpha = 0,05$ y dos colas.

b) Recuperación (R): Es la cantidad de analito agregado a una muestra cuando esta es fortificada. Es un parámetro analítico importante, ya que permite ver el rendimiento del método analítico desde la extracción de la muestra hasta el análisis instrumental.

La recuperación (R) y el porcentaje de recuperación ($\%R$), se determinan a través de la ecuación 8 y 9:

$$R = \frac{C_e - C_0}{C_a} \quad \text{Ecuación 8}$$

Dónde:

- C_e : Concentración del analito agregada a la muestra.
- C_0 : Concentración del analito en la muestra sin fortificar.
- C_a : Concentración del analito de la muestra fortificada.

$$\%R = R \cdot 100 \quad \text{Ecuación 9}$$

El criterio para evaluar la recuperación está dado por:

$$t_{calculado} \leq t_{critico}$$

El $t_{calculado}$ se calcula a través de:

$$t_{calculado} = \frac{[100-\%R]}{S \cdot \sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 10}$$

Dónde "S" corresponde a la desviación estándar de las lecturas del porcentaje de recuperación, y "n" corresponde al número de lecturas o valores observados. Por lo tanto, si el criterio se cumple no hay diferencias estadísticas significativas por lo que no es necesario hacer correcciones al método.

La recuperación esperada depende directamente de la concentración del analito en la cual es fortificada una muestra. Los valores aceptados de la AOAC de recuperación según el rango de concentración utilizado se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Porcentaje de recuperación según AOAC según concentración de analitos.

Rango de concentración	% min.	% máx.
10% al 100%	98	102
1%	97	103
0,1%	95	105
100 mg/L	90	107
100 µg/L a 10 mg/L	80	110
10 µg/L	60	115
1 µg/L	40	120

1.5.3.7. Incertidumbre

La incertidumbre es un parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al valor a medir. Por ello, que la incertidumbre de la medición del método analítico se expresará en términos de repetibilidad y reproducibilidad de las mediciones.

Para determinar la incertidumbre de la medición expandida (U), previamente se calcula la incertidumbre combinada (u_c) a través de la Ecuación 11:

$$u_c = \sqrt{u_{pir}^2 + (u_R/R)^2} \quad \text{Ecuación 11}$$

Dónde:

u_c = Incertidumbre relativa combinada.

u_{pir} = Incertidumbre relativa asociada a la precisión del método.

(u_R/R) = Incertidumbre relativa de la recuperación (R).

La incertidumbre expandida (U), se calcula a través de la Ecuación 12:

$$U = K \cdot u_c \quad \text{Ecuación 12}$$

Dónde:

U = Incertidumbre expandida.

K = Factor de cobertura 2, para un nivel de confianza de 95%.

El valor de incertidumbre expandida (U), permitirá establecer el intervalo entorno al resultado de la medición en el cual se puede esperar que se incluya la mayor fracción de la distribución de los valores que se pueden atribuir razonablemente al mesurando.

A través del desarrollo analítico del trabajo de investigación presentado, se podrá obtener un método específico para la determinación y cuantificación de HAPs en matriz suelo y sedimento, el cual será de gran relevancia ya que permitirá un análisis eficiente y una rápida toma de decisiones al momento de ocurrir vertimientos de petróleo en el mar o en suelos a lo largo de Chile.

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo general

Determinar hidrocarburos presentes en suelo y sedimento frente a un derrame de petróleo, mediante el análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) por cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MS).

1.6.2. Objetivos específicos

- Optimizar las condiciones instrumentales para caracterizar y cuantificar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) mediante cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MS).
- Desarrollar un método de extracción acelerada con solvente (ASE) para cuantificar, hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelo y sedimento.
- Validar el método analítico implementado, mediante determinación de las propiedades analíticas.

II - MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

- Navecilla de plástico.
- Espátula de acero inoxidable.
- Tubos de polipropileno 50 mL.
- Gradilla.
- Puntas para micropipeta de 100 μ L, 1000 μ L.
- Puntas para macropipeta de 10 mL.
- Embudo para celda de extracción.
- Herramienta recta para empuje de muestra.
- Filtro de microfibra de celulosa 110 mm, Whatman.
- Tijeras.
- Celda de extracción 66 mL de Extractor Acelerado con Solvente.
- Botellas de colección de 250 mL para ASE.
- Matraz de aforo 10 mL.
- Matraz de aforo de 1L.
- Viales de recogida de 60 mL para ASE.
- Jeringa plástica 10 mL.
- Filtros para jeringa de 0,45 μ m.
- Vial de vidrio ámbar 2 y 10 mL.
- Hidrómetro de suelo, Ertco 2152H.
- Gas Helio (He), alta pureza marca Air Liquide.
- Elementos de protección personal.
- Material de vidrio necesario para el desarrollo analítico.

2.2. Equipos

- Extractor Acelerado de Disolvente Dionex (ASE) 350, Thermo Fisher.
- Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A con detector selectivo de masas (GC-MS) Agilent Technologies 5975C.
- Evaporador Rocket Genevac.
- Balanza analítica digital de Precisión $2100 \pm 0,1$ g, modelo Precisa.
- Balanza analítica Sartorius TE Talent 210 g de división 0,1 mg.
- Multi Vortex digital Heidolph, modelo Multi Reax.
- Campana con extractor de gases.
- Micropipetas de 100 μ L, 1000 μ L.
- Pipeta 10 mL.
- Tamiz modelo V8SF #20 de 0,85 mm.
- Cámara fría temperatura 7°C, Danfoss.

2.3. Reactivos

- Solución estándar de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH Mix) 100 ng/ μ l en acetonitrilo Dr. Ehrenstorfer.
- Estándar interno Naftaleno D8 Dr. Ehrenstorfer pureza 98,3%
- Estándar interno Pireno D10 Dr. Ehrenstorfer pureza 97,7%
- Acetona grado HPLC Lichrosolv Merck.
- Cloruro de Metileno grado HPLC Fisher Scientific.
- Agua desionizada grado reactivo Merck.
- Tierra de diatomeas, SiO₂, 95% Sigma Aldrich.
- Sílica gel 60 Merck.

2.3.1. Preparación solución estándar de trabajo (Hidrocarburos aromáticos policíclicos)

Se prepararon soluciones de trabajo de HAPs de concentración 5 mg/L a partir de una solución stock de 100 mg/L. Para ello se tomó 500 μ L de la solución estándar y se llevó a un matraz de aforo de 10 mL, utilizando acetona grado HPLC como solvente.

Se prepararon tantas soluciones como fue necesario para llevar a cabo la optimización y validación, las cuales fueron guardadas en viales ámbar de 10 mL a una temperatura de -20°C.

2.3.2. Preparación estándar subrogante Naftaleno D8

A partir de un compuesto puro de Naftaleno D8 de 0,1 g pureza 98,3%, se prepararon soluciones stock \approx 1000 mg/L, intermedia de 100 mg/L y de trabajo de 5 mg/L.

Se masó 11,2 mg del analito y se aforó a 10 mL, obteniendo una concentración de 1.120 mg/L (solución stock). Se tomó 893 μ L de solución stock y se aforó a 10 mL, para solución intermedia de 100 mg/L. La solución de trabajo se obtuvo tomando una alícuota de 500 μ L de solución intermedia y se llevó a un volumen final de 10 mL.

Todas las soluciones preparadas, se realizaron utilizando acetona grado HPLC como solvente, las cuales fueron guardadas en viales ámbar y refrigeradas a una temperatura de -20°C.

2.3.3. Preparación estándar subrogante Pireno D10

Se prepararon soluciones stock \approx 1000 mg/L, intermedia de 100 mg/L y de trabajo de 5 mg/L a partir de un estándar puro de pireno D10 de 0,1 g, pureza 97,9%.

Para la preparación de la solución stock, se masó 10,6 mg de estándar puro y se aforó a 10 mL con acetona, obteniendo una concentración 1.060 mg/L. Para la solución intermedia de 100 mg/L se tomó una alícuota de 943 μ L de la solución stock y se aforo en un matraz de 10 mL. Finalmente, para las soluciones de trabajo se tomó alícuotas de 500 μ L de la solución intermedia y se llevó a un matraz de aforo de 10 mL.

Todas las soluciones preparadas, se realizaron utilizando acetona grado HPLC como solvente, las cuales fueron guardadas en viales ámbar de 10 mL y refrigeradas a una temperatura de -20°C .

La concentración de la solución stock puede variar dependiendo de los gramos masados del compuesto, por ello también cambiaría las alícuotas necesarias para la preparación de la solución intermedia y de trabajo. Si es necesario, recalcularse el volumen final en cada caso (2.3.2 – 2.3.3).

2.4. Caracterización instrumental de hidrocarburos aromáticos policíclicos

Se realizó la caracterización de HAPs mediante el GC-MS, inyectando una solución multiestándar en el modo de operación Full Scan. Se identificaron los tres iones más abundantes de cada analito de la solución multiestándar de HAPs (16 analitos), mediante una búsqueda en la librería de espectro de masas de la NIST. Luego, se buscaron las condiciones instrumentales óptimas para obtener el mejor cromatograma para los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos.

La caracterización de hidrocarburos aromáticos policíclicos mediante GC-MSD, se llevó a cabo utilizando una solución multiestándar de HAPs de 5 mg/L en acetona. Para esto, se fue variando la rampa de temperatura del horno y la temperatura del inyector, con el fin de encontrar las condiciones óptimas que permitan una buena separación de los analitos de interés (Tabla 6). Las condiciones mostradas, son utilizadas para HAPs en matriz suelo y sedimentos.

Tabla 6. Condiciones cromatográficas utilizadas en caracterización.

Detector	Selectivo de masas (MSD)
Columna	HP-5MS (0,25 mm x 30 m x 0,25 μ m)
Temperatura Horno	60°C (2 min) 25°C/min hasta 160°C (1 min) 6°C/min hasta 300°C (8 min)
Temperatura inyector	250°C
Tiempo de corrida	34 min
Modo inyección	Splitless
Gas portador	Helio, flujo 1,5 mL/min
Solvent delay	4,0 min
Volumen inyección	2 μ L

Elegidas las condiciones cromatográficas, se implementó el modo SIM (monitoreo selectivo de iones) donde se registró un ion cuantificador y un par de iones verificados característicos para cada analito y los tiempos de retención correspondientes.

La caracterización permitió obtener la relación de abundancia entre el ion target (ion cuantificador) y iones Q₁ y Q₂, correspondiente a los iones cualificadores.

Se registraron los tiempos de retención (min), ión cuantificador (tg) y verificadores (Q₁ y Q₂) y las respectivas relaciones de abundancia para cada analito (Tabla 7).

Tabla 7. Tiempos de retención, ion cuantitativo y iones verificadores (Q₁ y Q₂) para los 16 hidrocarburos del compuesto HAPs.

Analito	Ion Cuantificador	Ion Verificador (Q ₁)	Ion Verificador (Q ₂)	Tiempo de retención (min)
Naftaleno	128	129	127	5,912
Naftaleno D8	136	129	127	5,848
Acenaftileno	152	153	151	7,939
Acenafteno	153	154	152	8,281
Fluoreno	166	165	167	9,346
Fenantreno	178	176	179	11,865
Antraceno	178	179	176	11,996
Fluoranteno	202	203	200	15,773
Pireno	202	203	200	16,511
Pireno D10	212	-	-	16,267
Benzo[a]antraceno	228	226	229	21,056
Criseno	228	226	229	21,178
Benzo[b]Fluoranteno	252	253	250	24,910
Benzo(k)Fluoranteno	252	253	250	25,004
Benzo(a)pireno	252	253	250	25,930
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	276	277	274	29,342
Dibenzo[a,h]antraceno	278	279	276	29,477
Benzo(g,h,i)perileno	276	277	138	30,008

2.5. Optimización extracción ASE

2.5.1. Preparación de la muestra previa a la extracción

El siguiente procedimiento describe el tratamiento de la muestra previa a la extracción, la cual se repitió para cada método a estudiar en matriz suelo y sedimento en forma independiente. Debido a que ambas matrices corresponden a muestras entregadas por el laboratorio, se realizó previamente una caracterización de cada una. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Caracterización matrices ambientales suelo y sedimento utilizado para optimización.

Parámetros	Suelo	Sedimento
Textura	Arcilloso-arenoso	Arenoso
pH	7,28	7,66
Conductividad	0,81 dS/m	5,89 dS/m
% de humedad	2,04	16,28
Pérdida por calcinación (Carbono orgánico)	4 %	14 %
Materia orgánica	3,2 %	-

Procedimiento:

- Se masó 10 g de muestra en una navecilla de plástico previamente tamizado, utilizando un tamiz modelo V8SF #20 de 0,85 mm. Se transfirió a un tubo de polipropileno de 50 mL.

- Se fortificó una muestra a una concentración de 157 $\mu\text{g}/\text{kg}$ con 314 μL de solución multiestándar de HAPs de 5 mg/L. Se dejó agitando durante 24 h en multi vortex, con el fin de favorecer la adsorción de hidrocarburos en suelo y sedimentos.
- Para matriz suelo, se agregó 2,5 g de tierra de diatomeas, mientras que para sedimento se agregó 5,0 g, debido a un mayor contenido de humedad presente en la matriz, mezclando durante 30 minutos en multi vortex.
- En forma paralela, se masó 15 g de silica gel.
- Se transfirió la matriz mezclada con tierra de diatomeas, el adsorbente silica gel y se agregó dos filtros de celulosa en la celda de extracción de 66 mL, tal como se muestra en la Figura 7. Se arrastró con solvente acetona grado HPLC el sólido contenido en el tubo de polipropileno y se agregó a la celda de extracción.
- Disponer un frasco de 250 mL para recolectar el volumen final de la muestra una vez terminada la extracción.

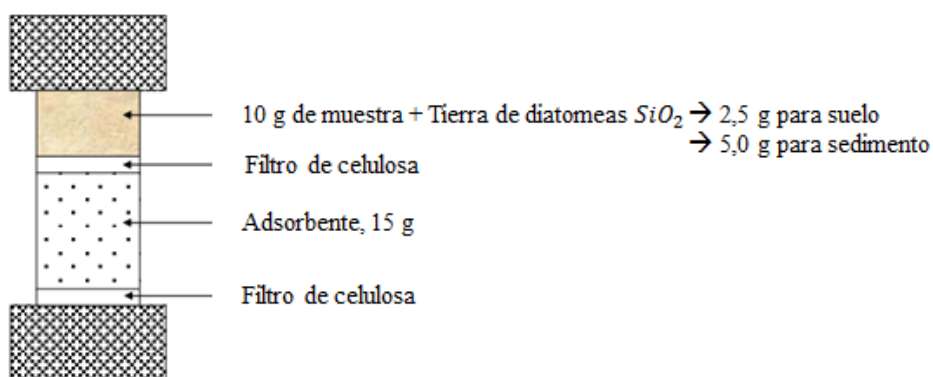


Figura 7. Esquema de preparación de muestra en celda del equipo ASE.

En la Figura 8, se observa el tratamiento previo de la muestra, desde que se fortifica hasta el inicio de la extracción, proceso que demora aproximadamente 60 minutos.

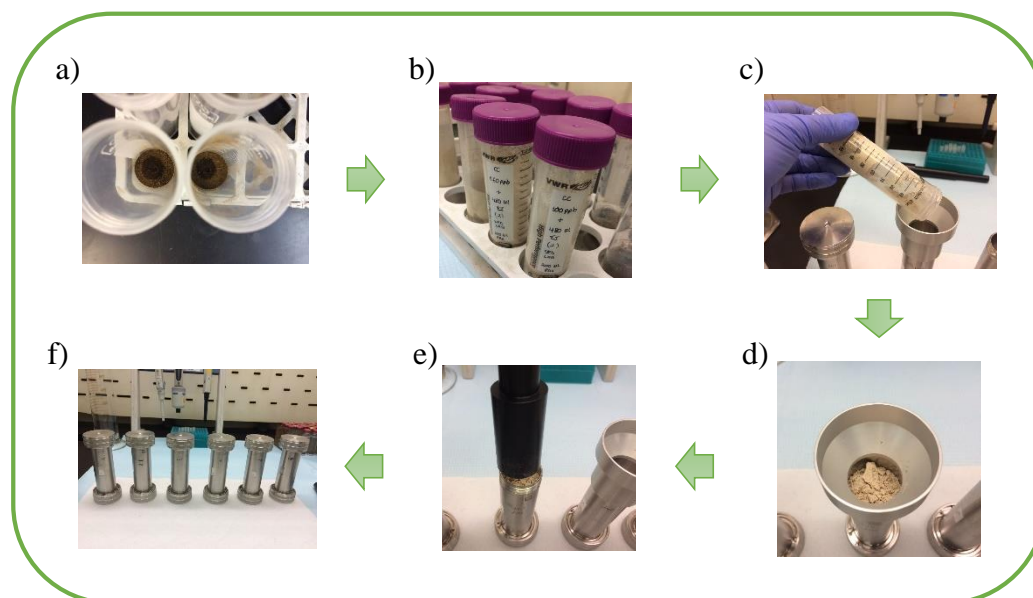


Figura 8. Preparación de muestra previa a la extracción acelerada con solvente. a) Fortificación de muestra.; b) Muestra más tierra de diatomeas luego de ser agitada durante 30 min.; c) Introducción de filtros, adsorbentes y muestra a la celda de extracción ASE.; d) Adsorbente, muestra y filtros ubicados en la celda.; e) Compactación con pistilo.; f) Celdas preparadas para extracción ASE.

2.5.2. Parámetros de extracción

En la optimización de la metodología empleada se aplicó un diseño factorial con cinco variables: solvente, temperatura, tiempo de extracción estático, volumen de enjuague y tiempo de purga, cada uno elegido con dos niveles: bajo y alto. Para el análisis estadístico se utilizó el software Minitab 17, con el cual se logró seleccionar los

parámetros de extracción óptimos. El diseño factorial corresponde a 32 experimentos distintos, se detalla en la Tabla A1 (anexo). La Tabla 9 muestra los niveles utilizados para los factores estudiados.

Tabla 9. Diseños factoriales completos de 2 niveles utilizado para la optimización ASE.

Factor	Nivel bajo	Nivel alto
Acetona/diclorometano	1:1	1:9
Temperatura (°C)	100	150
Tiempo extracción estático (min)	5	10
Volumen de enjuague (%)	60	80
Tiempo de purga (s)	160	200

Cabe destacar, que el Extractor Acelerado con Solvente utilizado en esta metodología para la extracción de muestras sólidas, no había sido manipulado para estos fines en el Laboratorio de la Sección Química ambiental del instituto de Salud Pública de Chile, por lo que se desarrolló el instructivo de uso correspondiente a este equipo el cual facilitará los procedimientos futuros (Anexo).

2.5.3. Tratamiento muestra posterior a la extracción

- Extraída la muestra, se trasvasió el extracto desde el frasco de recogida de 250 mL a un vial de 60 mL, específicos para concentrar la muestra en Evaporador Rocket. Arrastrando el extracto remanente con acetona grado HPLC.

- Se concentró la muestra durante 60 minutos, hasta volumen final de 3 mL aproximadamente.
- Se trasvasijó el contenido a un matraz de aforo de 10 mL y arrastrar usando acetona grado HPLC como solvente.
- Se tomó una alícuota de 1,5 mL con jeringa plástica adherida a un filtro 0,45 μm y se trasvasijó a un vial ámbar de 2 mL.
- Los viales son guardados a una temperatura menor que 0°C hasta determinación final mediante cromatografía de gases.

En la Figura 9, se detalla cada uno de los equipos utilizados en el proceso analítico desde la preparación de la muestra, hasta la determinación final.



Figura 9. Equipos utilizados en metodología analítica.

2.6. Plan de validación método analítico

Se realizó un plan de validación para la metodología optimizada en matriz suelo y sedimento. La validación tiene como fin demostrar que se cumplen los requerimientos analíticos y que el método es adecuado para la determinación y cuantificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), asegurando la calidad y confiabilidad de los resultados. A continuación, se detalla el plan de validación en el cual se definió los parámetros necesarios y el diseño experimental, con el fin de establecer si el método se encuentra dentro de los criterios aceptables.

2.6.1. Selectividad

La evaluación de la selectividad permite corroborar que el método es capaz de identificar y cuantificar los analitos estudiados en presencia de interferentes que presenten un comportamiento análogo.

Para esto, se fortificó una muestra a una concentración de 625 $\mu\text{g/L}$ y una solución multiestándar de HAPs en solvente a la misma concentración. Ambas muestras fueron leídas mediante GC-MS y se comparó los cromatogramas entregados bajo las mismas condiciones de análisis.

2.6.2. Límites de detección y cuantificación

El límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) para cada analito se evaluó experimentalmente mediante la fortificación de 10 muestras en matriz a una concentración de 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$, utilizando una curva de calibración interna de concentraciones 32, 90, 150, 210, 270 y 313 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Se agregó 480 μL estándar interno Naftaleno D8 y Pireno D10 para obtener una concentración de 240 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

2.6.3. Linealidad y sensibilidad

La evaluación de la linealidad y sensibilidad se realizó mediante la elaboración de tres curvas de trabajo en matriz, día por medio, con seis puntos de calibración para HAPs cada una, mostrados en la Tabla 10. Se determinó el promedio del coeficiente de correlación en las tres curvas, con el fin de demostrar una correlación en la linealidad.

Tabla 10. Concentración utilizada para puntos de curva en suelo y sedimento.

	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5	Nivel 6
HAPs	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	160 $\mu\text{g}/\text{kg}$	310 $\mu\text{g}/\text{kg}$	440 $\mu\text{g}/\text{kg}$	630 $\mu\text{g}/\text{kg}$

2.6.4. Precisión

2.6.4.1. Repetibilidad

La precisión evaluada en términos de repetibilidad, se obtuvo a través de la fortificación de 10 muestras en matriz suelo a una concentración de 240 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Esto se

llevó a cabo el mismo día, por el mismo analista, utilizando los mismos equipos en un corto intervalo de tiempo.

2.6.4.2. Reproducibilidad

La precisión evaluada en término de reproducibilidad, se realizó mediante la fortificación a una concentración 440 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a un total de 10 muestras, en dos días distintos, trabajando 5 muestras por día.

El criterio de aceptabilidad para repetibilidad y reproducibilidad está dado por el coeficiente de variación de Horwitz $\text{CVr}\%$ y $\text{CVri}\%$, respectivamente, el cual depende del nivel de concentración utilizado en cada uno de los casos (Tabla 11).

Tabla 11. Coeficiente de variación de Horwitz dependiendo de la concentración.

		Repetibilidad	Reproducibilidad Intralaboratorios
Unidades	Concentración	$\% \text{CVr}_{\text{Horwitz}}$	$\% \text{CVri}_{\text{Horwitz}}$
$\mu\text{g}/\text{kg}$	240,0	9,92	13,22
$\mu\text{g}/\text{kg}$	440,0	9,05	12,07

2.6.5. Exactitud

2.6.5.1. Recuperación

Para determinar la recuperación en matriz suelo se fortificaron 6 muestras a dos niveles de concentración, tres muestras a 240 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y tres muestras a 440 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y para

sedimento las concentraciones fueron 70 µg/kg y 240 µg/kg. En ambos casos, las muestras fueron extraídas y cuantificadas el mismo día de análisis.

Con esto, se obtuvo el promedio del porcentaje de recuperación para cada analito y se evaluó según el rango de concentraciones entregado por la AOAC (Tabla 5).

2.7. Análisis de muestras reales

El muestreo se realizó durante el mes de octubre del 2017 en la bahía de Quintero, a 32° 47' de Latitud Sur y 71° 33' de Longitud Oeste. Se eligieron 10 sitios de muestreo a lo largo de la bahía, cuyas ubicaciones se localizan en la Figura 10 y sus coordenadas se especifican en la Tabla 12. El muestreo se realizó en base a las recomendaciones de la “Guía para muestreo de suelos, 2014” del Ministerio del medio Ambiente.

A través de un sondeo manual, se recolectaron 10 muestras compuestas de sedimentos superficiales a lo largo de la bahía a una profundidad de 0-10 cm, formadas por 4 muestras simples de 50 g cada una. Inmediatamente después de la recolección, las muestras se almacenaron en frascos de vidrio de 500 mL recubiertos de papel aluminio, previamente lavados con acetona grado HPLC, se guardaron en una nevera y fueron transportados al laboratorio para su análisis. En el laboratorio, las muestras se situaron en una cámara fría a 5°C, aisladas de la luz hasta su posterior procesamiento.



Figura 10. Localización geográfica de sitios de muestreo Bahía de Quintero.

Tabla 12. Localización geográfica de 10 sitios de muestreo en la Bahía de Quintero.

Sitio de muestreo (SM)	Latitud	Longitud
1	-32,78357	-71,52272
2	-32,78426	-71,51891
3	-32,78352	-71,51053
4	-32,77903	-71,50003
5	-32,77531	-71,49519
6	-32,76640	-71,48814
7	-32,76197	-71,48632
8	-32,75251	-71,41468
9	-32,74820	-71,48495
10	-32,74591	-71,48522

Se analizó los 16 HAPs prioritarios en los 10 sitios de muestreo de sedimento. Para ello se extrajeron utilizando el procedimiento implementado y validado de extracción acelerada con solvente para sedimento y determinación por medio de GC-MS.

Brevemente, se tomaron 10 g de muestra de sedimento, se homogenizó en un tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL junto con 5 g de tierra de diatomeas, además se agregó como estándar interno 480 μ L de Pireno-D10 y Naftaleno-D8 de concentración 5 mg/L. El blanco se preparó siguiendo el mismo procedimiento sin agregar muestra de sedimento.

Todas las muestras fueron agitadas en el vórtex durante 30 minutos, con el fin de homogenizar la muestra. Luego las muestras se sometieron a la extracción acelerada con solvente, utilizando la mezcla de acetona/diclorometano 1: 9 (v/v). Todos los extractos fueron reducidos a 5 mL en el concentrador Rocket y llevados a un volumen final de 10 mL con acetona para su posterior lectura instrumental.

III - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Condiciones cromatográficas

La correcta selección de las condiciones cromatográficas en la caracterización de los HAPs, permitió obtener un cromatograma característico de los analitos en estudio. Dichas condiciones fueron válidas tanto para HAPs en matriz suelo, como en sedimento.

La Figura 11 y 12, muestra el cromatograma del multiestándar de HAPs para suelo y sedimento, respectivamente.

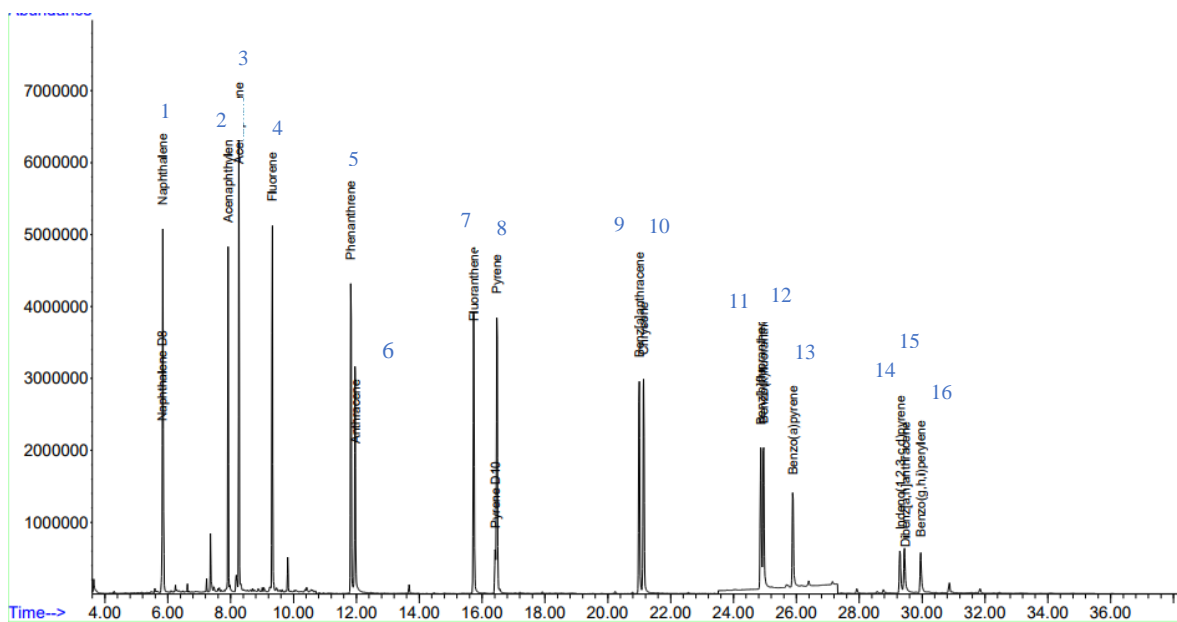


Figura 11. Caracterización de HAPs en matriz suelo de concentración 625 $\mu\text{g}/\text{kg}$ leídos por GC-MS. 1= Nap, 2= Acy, 3=Ace, 4= Flu, 5= Phe, 6= Ant, 7= Flt, 8= Pyr, 9= B[a]A, 10= Chr, 11= B[b]F, 12= B(k)F, 13= B(a)P, 14= I(1,2,3-c,d)P, 15= D[a,h]A, 16= B(g,h,i)P.

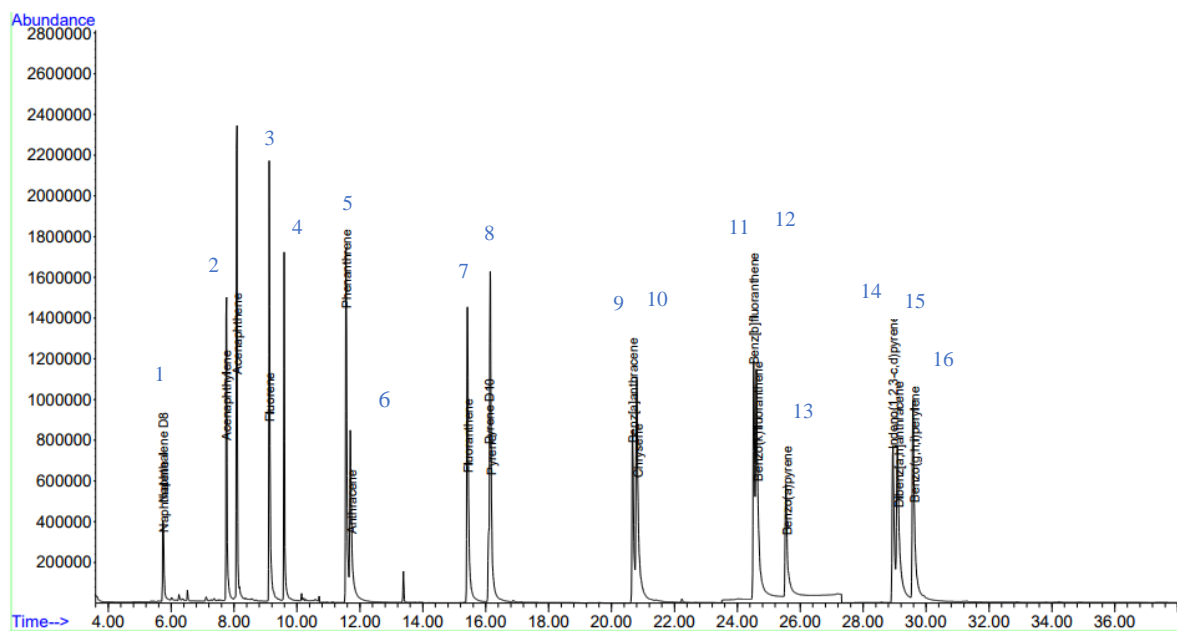


Figura 12. Caracterización de HAPs en matriz sedimento de concentración 630 $\mu\text{g}/\text{kg}$ leídos por GC-MS. 1= Nap, 2= Acy, 3=Ace, 4= Flu, 5= Phe, 6= Ant, 7= Flt, 8= Pyr, 9= B[a]A, 10= Chr, 11= B[b]F, 12= B(k)F, 13= B(a)P, 14= I(1,2,3-c,d)P, 15= D[a,h]A, 16= B(g,h,i)P.

3.2. Efecto matriz en la optimización de HAPs en suelo y sedimento

Previo a la optimización y validación del método analítico estudiado, se realizó un estudio de los analitos, su interacción con la matriz (suelo) y las variaciones en la respuesta instrumental. Para ello se hicieron dos tipos de curva: una curva de calibración en matriz interna (fortificación de la matriz a distintos niveles de concentración y luego se realizó la extracción) y una curva de calibración externa.

La Figura 13, muestra la respuesta instrumental bajo ambos tipos de curva de calibración.

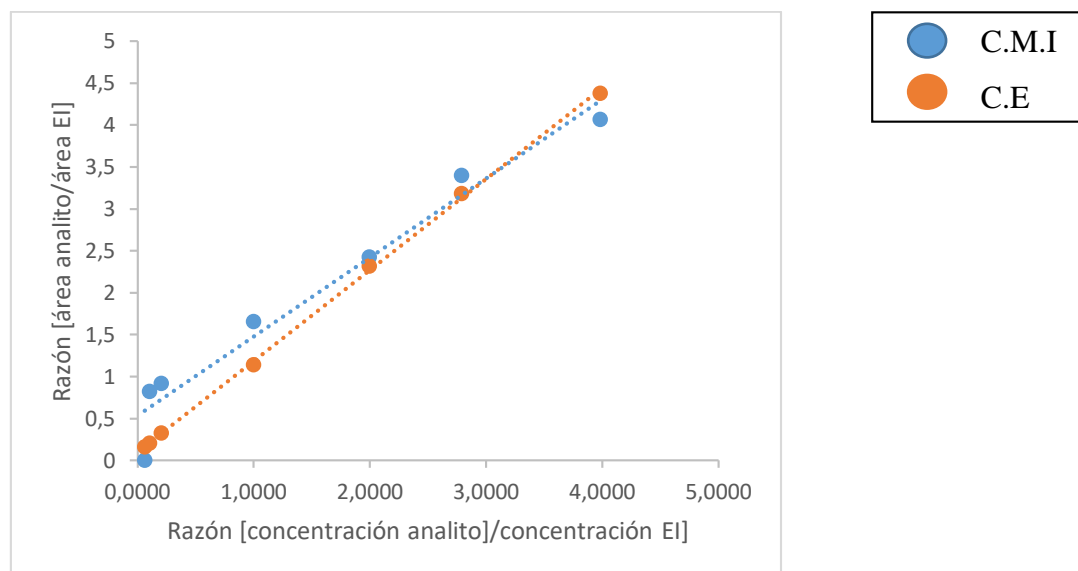


Figura 13. Evaluación de la respuesta instrumental para Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. C.M.I: Curva en matriz interna, C.E: Curva externa.

De acuerdo con la Figura 13, ambas curvas presentan diferentes pendientes, es decir, hay una interacción entre matriz y analitos, debido principalmente a los componentes presentes en el suelo; además, de las pérdidas generadas en el proceso extracción. Por lo tanto, en la optimización y validación del método analítico, se trabajó con curva de calibración por el método de adición estándar, lo cual es representativo de la interacción existente entre matriz - contaminante y las pérdidas durante la extracción estarán consideradas en la determinación final.

3.3. Efecto de distintos adsorbentes en la extracción ASE

El sistema de extracción ASE permite incorporar la limpieza (clean-up) del extracto dentro del mismo proceso de extracción.

En primer lugar, se verificó el efecto del adsorbente sobre la limpieza del extracto al interior de una celda, utilizando sílica gel de acuerdo a la literatura consultada; y posteriormente se comparó el efecto de dos adsorbentes más, para observar con cual se obtiene un extracto con menos interferentes, estos corresponden a florisil y PSA (aminas primarias y secundarias). Los ensayos se efectuaron sobre una muestra de suelo.

En la Figura 14, se muestran los extractos obtenidos bajo las mismas condiciones en la metodología ASE, al extraer una muestra de suelo con presencia y ausencia de sílica gel.

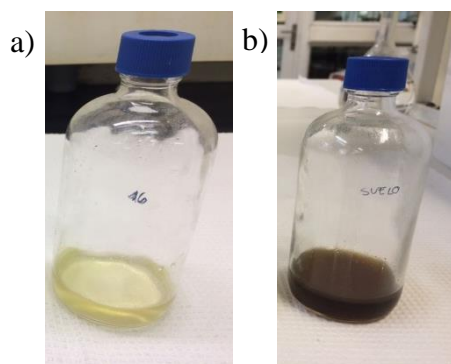


Figura 14. Estudio de efecto clean-up (limpieza) en el proceso de extracción. a) Tratamiento de muestra de suelo con presencia de sílica gel. b) Tratamiento de muestra de suelo con ausencia de sílica gel.

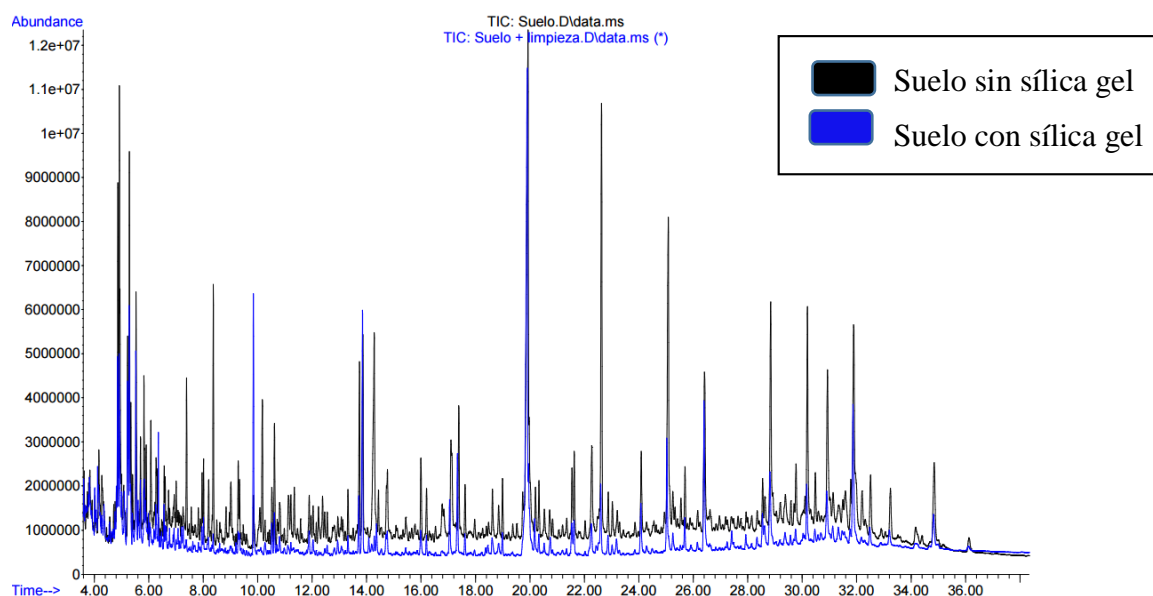


Figura 15. Comparación cromatograma de muestra extraída con presencia y ausencia de sílica gel.

Como se muestra en la Figura 14, la incorporación de un adsorbente en la celda de extracción permite la limpieza del extracto final, lo cual se observa mediante la tonalidad más clara obtenida. Además, en el cromatograma de la muestra que se utilizó sílica gel (Figura 15), se logra obtener una disminución de la línea base y una mayor claridad de las señales cromatográficas de los analitos de interés. En este caso, la sílica gel actúa eliminando los componentes polares del suelo, siendo útil para el uso previsto.

Una vez confirmado que el adsorbente elimina algunos analitos co-extraídos junto con los analitos de interés, se estudió el efecto de tres adsorbentes, florisil, sílica gel y PSA, con el fin de evaluar cuál de éstos entrega una mejor respuesta instrumental. Para esto, se realizaron extracciones independientes bajo las mismas condiciones de análisis, a las cuales se agregó cada adsorbente a la celda de extracción junto con la muestra.

Los resultados de los extractos se observan en la Figura 16 y la superposición de los cromatogramas de cada uno se muestra en la Figura 17.

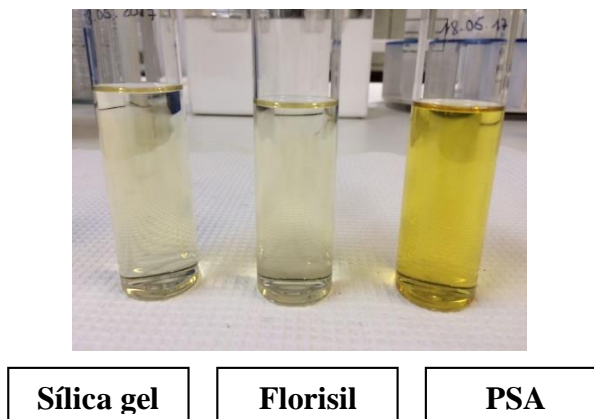


Figura 16. Evaluación de tres adsorbentes diferentes en la etapa de limpieza en el método ASE sobre una muestra de suelo.

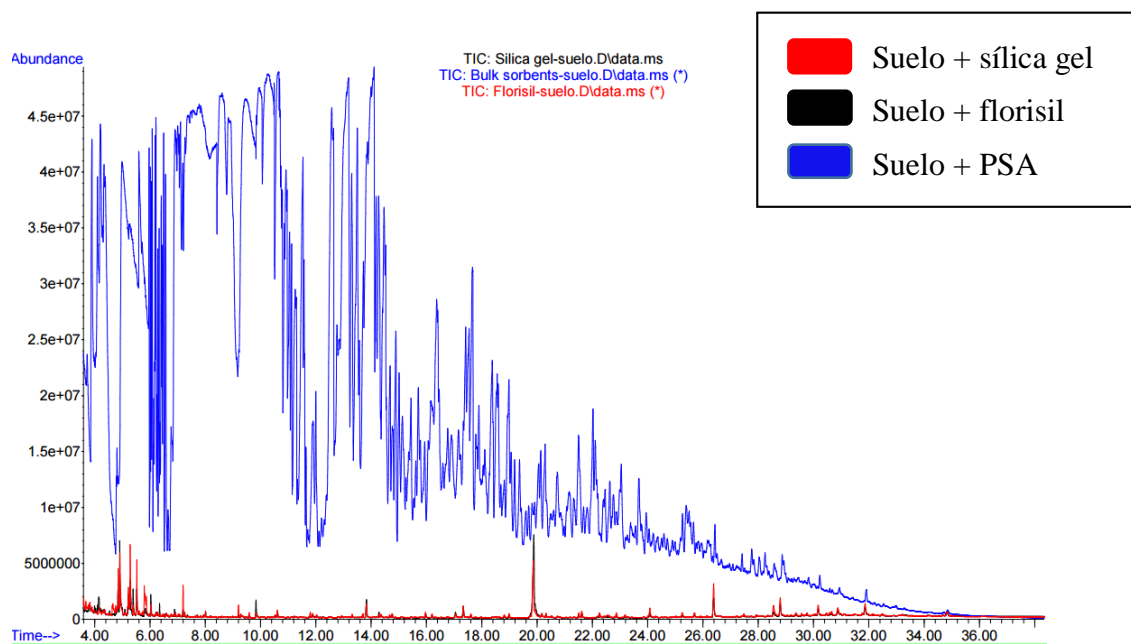


Figura 17. Análisis instrumental en la evaluación de diferentes adsorbentes en la etapa de limpieza para el método de extracción.

En la evaluación de los tres tipos de adsorbentes (Figura 16), se logra visualizar que existe una mayor tonalidad de color del extracto en la utilización de PSA, sobre la sílica gel y el florisil. Por lo que se puede presumir a grandes rasgos una menor efectividad de la limpieza.

Al analizar de manera instrumental (GC-MS) la limpieza de los extractos con los diferentes adsorbentes, se confirma que la utilización de PSA es inadecuada para la etapa de limpieza. Los resultados obtenidos en el cromatograma (Figura 17), muestra una cantidad de interferentes co-extraídos considerables en la etapa de extracción. Su bajo rendimiento se puede deber a que sus principales componentes; aminas primarias y secundarias, facilita la eliminación de ácidos orgánicos y de pigmentos polares, entre otros, las cuales son sustancias poco extraídas con solventes orgánicos apolares, como en este caso.

Si bien, la sílica gel y florisil son adsorbentes que actúan en forma similar, se seleccionó finalmente sílica gel, debido a que es más específica para la limpieza de extractos apolares, como son los HAPs, de acuerdo a lo estipulado a la literatura. Además, tiene la capacidad de formar fuertes puentes de hidrógeno con los componentes polares y descomponer los interferentes.

3.4. Resultados optimización metodología ASE

Los resultados se sometieron a un análisis de tipo factorial, en el cual a través del programa Minitab 17, se comparó estadísticamente los factores y los respectivos niveles de cada uno. Se determinaron las diferencias significativas de los factores en la adsorción de hidrocarburos sobre el suelo y sedimentos con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0,05$).

Esto se observa visualmente en el **Diagrama de Pareto de Efectos Estandarizados**, el cual muestra los valores absolutos de los efectos estandarizados en forma decreciente para cada uno de los analitos de interés, por lo tanto, en dicha gráfica se observa la importancia y la magnitud de los efectos. La línea de referencia (roja) indica los efectos significativos, es decir, los factores que se encuentran por sobre la línea de corte son significativos y los factores que están por bajo la línea de corte, no lo son.

Estadísticamente, si el valor de p value está por bajo del nivel de significancia ($\alpha \leq 0,05$) la diferencia es estadísticamente significativa y los datos no siguen una distribución normal, es decir, el factor correspondiente genera efectos en el resultado final. Por el contrario, si p value está por sobre el nivel de significancia ($\alpha > 0,05$) la diferencia no es estadísticamente significativa, por lo tanto, dicho factor no genera cambios en el resultado final.

Para interpretar en qué nivel es significativo un factor, se utiliza la **Gráfica de Efectos Principales**, donde se observan las diferencias entre las medias de nivel para cada factor. Por tanto, esta gráfica además de confirmar si afecta o no un factor, entrega el nivel

(alto o bajo) en el cual es significativo. Si la línea es horizontal (paralela al eje x) no hay efecto principal. Si la línea no es horizontal, hay un efecto principal y en este caso, la inclinación de la pendiente indica en qué nivel la magnitud del factor genera cambios significativos.

3.4.1. Optimización método Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en suelo

Los resultados de la optimización del método de extracción de HAPs, entregan las mejores condiciones para cada uno de los 16 analitos estudiados. Como ejemplo, se muestra el Diagrama de Pareto del compuesto benzo(a)pireno (Figura 18), el cual es reiterativo y presenta un comportamiento similar para cada uno de los HAPs en matriz suelo.

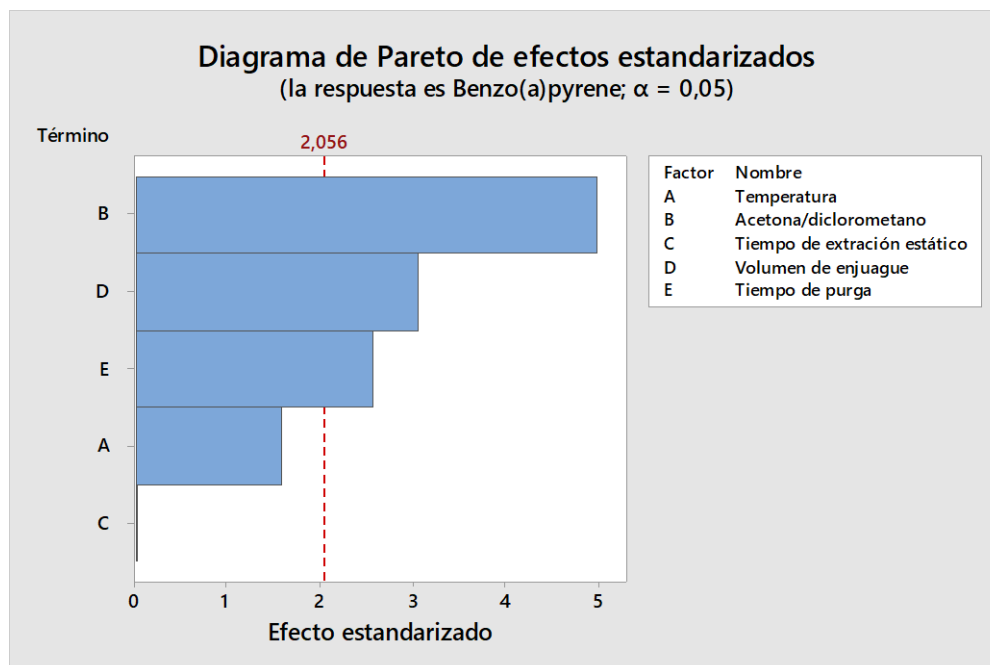


Figura 18. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para Benzo(a)pireno en suelo.

Como se observa en la Figura 18, los factores significativos que se encuentran por sobre la línea de referencia (de color rojo) son: solvente, volumen de enjuague y tiempo de purga, por tanto, dichos factores no siguen una distribución normal y su variación genera cambios importantes en la recuperación final.

Para conocer en qué nivel (alto o bajo) es significativo cada factor, se muestra la gráfica de **efectos principales** (Figura 19), correspondiente al benzo(a)pireno.

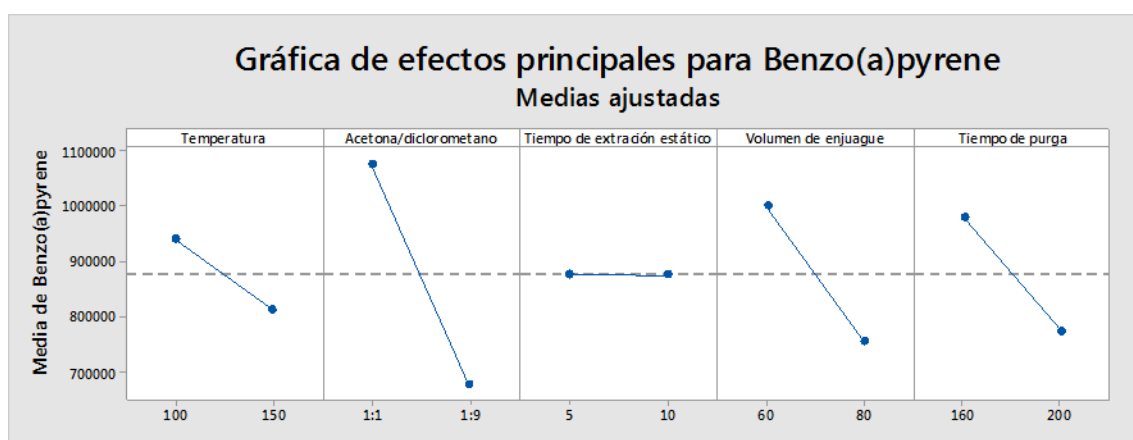


Figura 19. Gráfica de efectos principales para benzo(a)pireno.

Como se puede observar en la Figura 19, el solvente es significativo en mezcla acetona-diclorometano (1:1), utilizando un volumen de enjuague en un 60% y el tiempo de purga óptimo fue de 160 s. En este caso, a pesar de que la pendiente de la temperatura muestra una tendencia en 100°C, no es un factor significativo ya que se encuentra bajo la línea de referencia, de acuerdo al Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para benzo(a)pireno (Figura 18). El tiempo de extracción estático no muestra significancia, lo que se confirma con la pendiente nula o paralela al eje x. Por tanto, la solubilización de

los analitos en el solvente ocurre en un tiempo óptimo de 5 minutos, lo cual no variará al aumentar el tiempo de contacto entre ellos.

Los resultados estadísticos de la optimización de los HAPs se muestran en la Tabla 13 para cada analito, en la cual el valor de **p value** $\leq 0,05$ indicará el factor que tiene significancia.

Tabla 13. Parámetros evaluados estadísticamente en la optimización de la extracción de HAPs en suelo.

Analito	P value				
	Temperatura	Solvente	Tiempo de extracción estático	Volumen de enjuague	Tiempo de purga
Naftaleno	< 0,05	< 0,05	0,64	< 0,05	< 0,05
Acenaftaleno	0,94	< 0,05	0,78	< 0,05	0,10
Acenafteno	0,51	< 0,05	0,91	< 0,05	< 0,05
Fluoreno	0,24	< 0,05	0,86	< 0,05	< 0,05
Fenantreno	0,28	< 0,05	0,85	< 0,05	< 0,05
Antraceno	0,24	< 0,05	0,96	< 0,05	< 0,05
Fluoranteno	0,90	< 0,05	0,92	< 0,05	< 0,05
Pireno	0,80	< 0,05	0,93	< 0,05	< 0,05
Benzo[a]antraceno	0,82	< 0,05	0,90	< 0,05	< 0,05
Criseno	0,91	< 0,05	0,87	< 0,05	< 0,05
Benzo[b]fluoranteno	0,61	< 0,05	0,78	< 0,05	< 0,05
Benzo(k)fluoranteno	0,85	< 0,05	0,91	< 0,05	< 0,05
Benzo(a)pireno	0,12	< 0,05	0,98	< 0,05	< 0,05
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,80	< 0,05	0,99	< 0,05	< 0,05
Dibenzo[a,h]antraceno	0,73	< 0,05	0,65	< 0,05	< 0,05
Benzo(g,h,i)perileno	0,99	< 0,05	0,86	< 0,05	< 0,05

De acuerdo con la Tabla 13, se confirma los tres factores significativos: solvente, volumen de enjuague y tiempo de purga, los cuales se comportan de forma idéntica para los 16 analitos estudiados.

3.4.2. Optimización método Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en sedimento

Se analizó de la misma forma los HAPs en matriz sedimento. En este caso, solo el solvente es un factor estadísticamente significativo, que influye en la recuperación final de los hidrocarburos aromáticos policíclicos desde la matriz. En Figura 20 se observa el **diagrama de Pareto de efectos estandarizados** que muestra esta tendencia para el analito Naftaleno y que es reiterativo de los resultados para cada uno de los HAPs en dicha matriz.

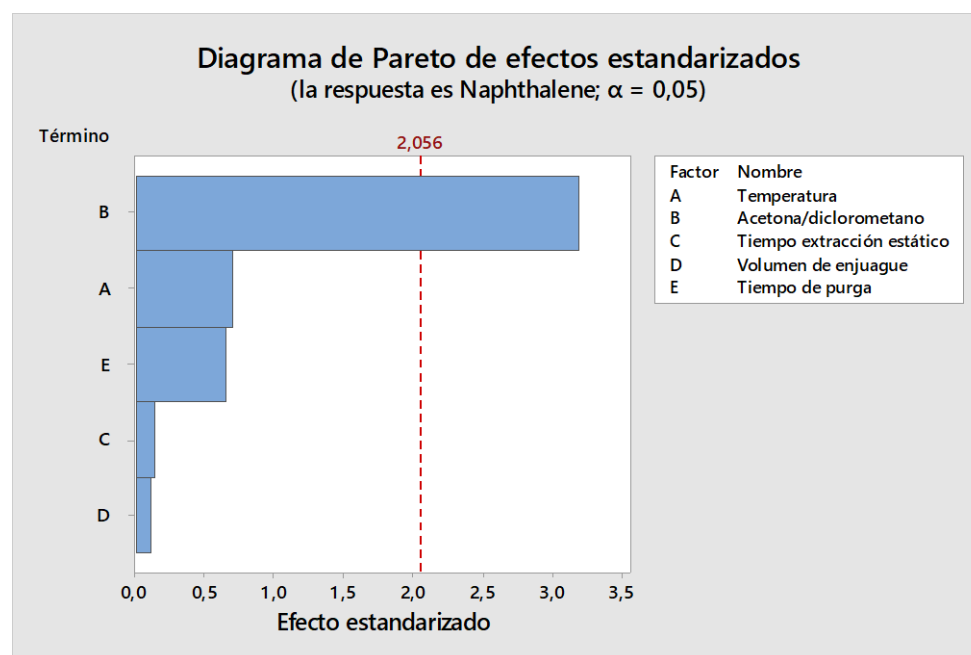


Figura 20. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para Naftaleno en sedimento.

De acuerdo con la Figura 20, el solvente se encuentra por sobre la línea de corte, por lo que no sigue una distribución normal y su variación es importante en la recuperación del analito estudiado. Esto confirma su comportamiento como factor significativo.

La gráfica de efectos principales (Figura 21) para este analito, muestra la razón de mezcla de solventes en el cual es óptima la extracción.

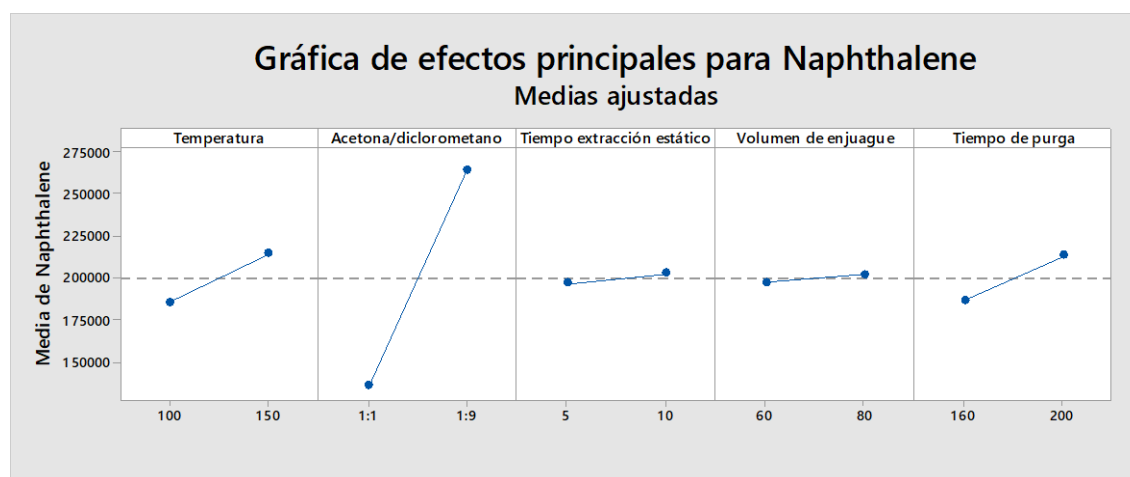


Figura 21. Gráfica de efectos principales para naftaleno.

En este caso, la pendiente del solvente muestra una tendencia para la mezcla acetona-diclorometano (1:9). El tiempo de extracción estático y volumen de enjuague además de no ser factores significativos tienen nula tendencia en la pendiente (paralela al eje x). La temperatura y el tiempo de purga tienen una pequeña inclinación en sus pendientes, pero no muestran significancia debido a que también se encuentran bajo la línea de referencia (Figura 21).

La confirmación de la similitud en los resultados de optimización para HAPs en sedimentos es entregado a través del valor de p-value, mostrados en la Tabla 14.

Tabla 14. Parámetros evaluados estadísticamente en la optimización de la extracción de HAPs en sedimentos.

Analito	P value				
	Temperatura	Solvente	Tiempo de extracción estático	Volumen de enjuague	Tiempo de purga
Naftaleno	0,49	< 0,05	0,89	0,91	0,52
Acenaftaleno	0,56	< 0,05	0,62	0,38	0,96
Acenafteno	0,76	< 0,05	0,65	0,32	0,66
Fluoreno	0,35	< 0,05	0,76	0,15	0,19
Fenantreno	0,15	0,20	0,34	0,08	0,34
Antraceno	0,63	0,21	0,54	0,70	0,18
Fluoranteno	0,43	< 0,05	0,05	0,44	0,74
Pireno	0,99	< 0,05	0,05	0,58	0,73
Benzo[a]antraceno	0,15	< 0,05	< 0,05	0,80	0,48
Criseno	0,97	< 0,05	< 0,05	0,80	0,85
Benzo[b]fluoranteno	0,84	< 0,05	0,28	0,80	0,57
Benzo(k)fluoranteno	0,61	< 0,05	0,36	0,88	0,74
Benzo(a)pireno	< 0,05	< 0,05	0,32	0,55	0,75
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,26	< 0,05	0,99	0,88	0,68
Dibenzo[a,h]antraceno	0,23	< 0,05	0,97	0,99	0,90
Benzo(g,h,i)perileno	0,05	< 0,05	0,82	0,83	0,86

Como se observa anteriormente, se confirma el solvente como único factor significativo para el 87,5% de los analitos estudiados.

A modo de resumen, en la Tabla 15 se muestran las condiciones óptimas de extracción, mediante la técnica de extracción acelerada con solvente para HAPs en suelos y sedimentos.

Tabla 15. Condiciones de extracción acelerada con solvente optimizadas para HAPs en suelos y sedimentos.

Analitos	HAPs	
	Suelo	Sedimento
Matriz	Suelo	Sedimento
Solvente	Acetona/DCM (1:1 v/v)	Acetona/DCM (1:9 v/v)
Temperatura	100 °C	150 °C
Tiempo de extracción estático	5 min	5 min
Número de ciclos estáticos	1	1
Volumen de enjuague	60 %	60 %
Tiempo de purga	160 s	200 s
Tamaño celda de extracción	66 mL de acero inoxidable	66 mL de acero inoxidable
Filtro	Celulosa (110 mm)	Celulosa (110 mm)
Tiempo de extracción total por muestra	23 min aprox	23 min aprox
Volumen de solvente total por muestra	70 mL	70 mL
Cantidad de muestra	10 g	10 g

Debido a las diferencias encontradas en las matrices trabajadas, se desarrollaron dos métodos distintos en paralelo. De acuerdo a los factores estudiados en la optimización, el solvente es el único parámetro estadísticamente significativo común entre ambos

métodos. Esto es debido principalmente por porcentaje de agua presente entre las matrices, siendo 2,04% y 16,28% para suelo y sedimento, respectivamente.

Si bien los HAPs son compuestos apolares es necesario tener una mezcla de solvente con diferentes polaridades para su extracción. Una muestra con mayor contenido de agua, dificulta la penetración del solvente apolar para interactuar con la fase sólida, siendo necesario una mayor proporción de solvente apolar para lograr extraer los contaminantes afines, por lo cual la mezcla de solventes mejora la extracción y disminuye el uso de solvente.

La razón para suelo de solvente 1:1, se explica porque la acetona es un solvente que disuelve los agregados del suelo, por lo que la utilización en mayor cantidad, ayuda a extraer mejor los analitos, al tener mayor superficie de contacto con ellos.

3.5. Evaluación parámetros de validación

La validación del método optimizado es la etapa fundamental donde a través de la determinación de diferentes propiedades analíticas con fundamento estadístico, se demuestra que el método desarrollado es adecuado para los fines previstos. A continuación, se muestran los resultados de validación para suelo y sedimento.

3.5.1. Selectividad

En la Figura 22, se observa la superposición de los cromatogramas entregados por GC-MS, correspondientes a los HAPs en matriz suelo versus HAPs en solvente. Con esto se logró verificar la capacidad del método para determinar los analitos específicos con interferencia de otros componentes.

Junto con esto, se considera que la GC-MS es un método selectivo por sí mismo, ya que su detector tiene la capacidad de diferenciar compuestos que presenten el mismo tiempo de retención, pero diferentes masas. Esto se logra gracias al filtro cuadrupolo acoplado al sistema que permite el análisis selectivo de ciertos iones.

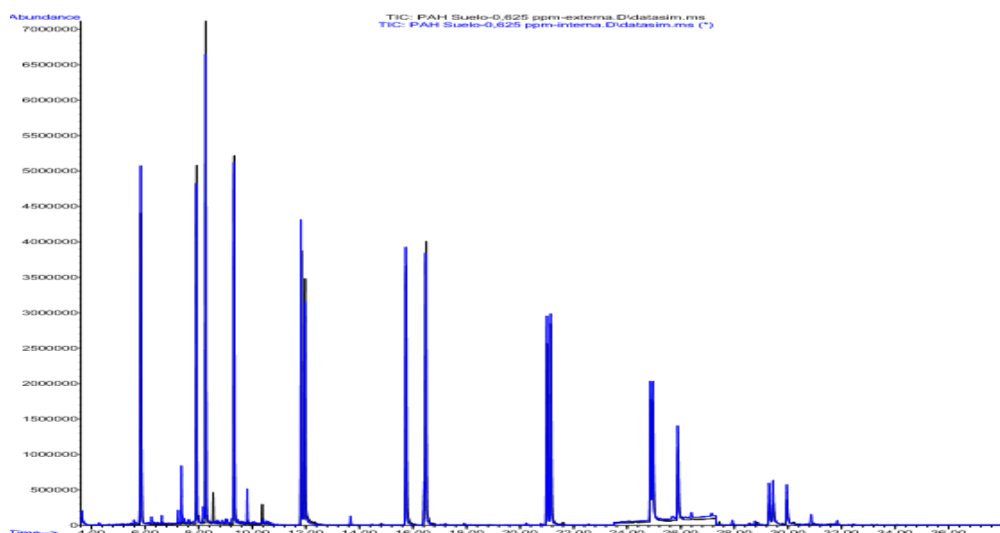


Figura 22. Superposición de cromatogramas analizados mediante GC-MS para muestras de HAPs en matriz suelo versus HAPs en solvente, utilizado para prueba de selectividad.

3.5.2. Límites

En Chile no existe normativa que fije los límites máximos permisibles (LMP) para HAPs en suelos y/o en sedimento, por lo cual no se puede verificar si los límites logrados cumplen con el requerimiento mínimo ($LD < \frac{1}{10}LMP$; $LC < \frac{1}{5}LMP$). En base a estos antecedentes se decidió analizar el límite de detección y cuantificación de la metodología implementada, utilizando como criterio la razón de conformidad (Ecuación 4). Este valor corresponde al cociente entre **concentración estándar y el límite de detección** obtenido, resultado que debe fluctuar entre 4 y 10. Los valores obtenidos en este rango indican que la concentración utilizada para la determinación de los límites es adecuada.

En la Tabla 16 se observan los valores de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) obtenidos para los 16 analitos en estudio en matriz suelo, donde los LD estuvieron entre 8,9 - 16,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y los LC se encontraron en un rango de 27,3 – 49,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Tabla 16. Resultados de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) del método Extracción Acelerada con Solvente y cuantificación por GC-MS de HAPs en suelo.

Analito	Límites			
	Desviación estándar σ	LD (n=10) $\mu\text{g/kg}$	LC (n=10) $\mu\text{g/kg}$	Razón de conformidad
Naftaleno	3,67	12,08	36,70	5,8
Acenaftileno	3,36	11,07	33,64	6,3
Acenafteno	3,78	12,42	37,75	5,6
Fluoreno	3,85	12,66	38,48	5,5
Fenantreno	4,99	16,44	49,96	4,3
Antraceno	4,97	16,34	49,68	4,3
Fluoranteno	4,85	15,95	48,48	4,4
Pireno	4,68	15,39	46,79	4,5
Benzo[a]antraceno	3,58	11,77	35,78	5,9
Criseno	3,36	11,05	33,57	6,3
Benzo[b]fluoranteno	4,83	15,89	48,30	4,4
Benzo(k)fluoranteno	4,12	13,56	41,22	5,2
Benzo(a)pireno	3,31	10,87	33,05	6,4
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	4,38	14,41	43,79	4,9
Dibenzo[a,h]antraceno	2,73	8,97	27,27	7,8
Benzo(g,h,i)perileno	4,60	15,12	45,95	4,6

De forma idéntica se determinó los límites para HAPs en matriz sedimento, los cuales son registrados en la Tabla 17.

Tabla 17. Resultados de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) del método Extracción Acelerada con Solvente y cuantificación por GC-MS de HAPs en sedimento.

Analito	Límites			
	Desviación estándar σ	LD (n=10) $\mu\text{g/kg}$	LC (n=10) $\mu\text{g/kg}$	Razón de conformidad
Naftaleno	4,77	15,68	47,66	4,5
Acenaftileno	-	-	-	-
Acenafteno	4,96	16,31	49,58	4,3
Fluoreno	3,19	10,51	31,93	6,7
Fenantreno	2,10	6,90	20,97	10,1
Antraceno	4,15	13,64	41,45	5,1
Fluoranteno	3,35	11,03	33,52	6,3
Pireno	3,65	12,02	36,53	5,8
Benzo[a]antraceno	4,01	13,20	40,12	5,3
Criseno	4,08	13,43	40,83	5,2
Benzo[b]fluoranteno	4,18	13,75	41,79	5,1
Benzo(k)fluoranteno	4,56	15,00	45,60	4,7
Benzo(a)pireno	4,52	14,88	45,22	4,7
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	4,28	14,09	42,81	5,0
Dibenzo[a,h]antraceno	3,72	12,25	37,24	5,7
Benzo(g,h,i)perileno	3,98	13,10	39,83	5,3

Según la razón de conformidad, en todos los compuestos se cumple el criterio establecido, encontrándose el límite de detección (LD) entre 6,9 – 16,3 $\mu\text{g/kg}$ y el límite de cuantificación entre los valores 20,9 – 49,6 $\mu\text{g/kg}$ para HAPs en sedimento. El

acenaftileno no se cuantificó mediante GC-MS, debido a que la señal correspondiente a este analito mostró ausencia en el cromatograma.

3.5.3. Linealidad y sensibilidad

Se obtuvo un coeficiente de correlación promedio de tres curvas de calibración en el rango de trabajo entre 50 y 630 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mayor a 0,99 para todos los analitos, en ambos métodos. El criterio de aceptabilidad de la linealidad se cumple cuando el coeficiente de determinación “ r^2 ” es mayor que 0,98 para cada analito, lo que indica que el modelo entrega una respuesta lineal en el rango estudiado.

Los resultados de dichos valores se encuentran detallados en la Tabla 18 para suelo y en la Tabla 19 para sedimento.

Tabla 18. Resultados de la linealidad y sensibilidad del método Extracción Acelerada con Solvente y cuantificación por GC-MS de HAPs en suelo.

Analito	Linealidad y sensibilidad		
	Promedio pendiente (n=3) (µg/kg)	Desviación estándar σ	Promedio coeficiente de determinación r^2
Naftaleno	9,04	0,0013	0,999
Acenaftileno	8,48	0,0019	0,998
Acenafteno	5,93	0,0013	0,999
Fluoreno	6,70	0,0058	0,997
Fenantreno	8,50	0,0042	0,995
Antraceno	7,99	0,0076	0,991
Fluoranteno	1,12	0,0037	0,997
Pireno	1,13	0,0013	0,999
Benzo[a]antraceno	6,46	0,0010	0,998
Criseno	1,14	0,0029	0,997
Benzo[b]fluoranteno	6,74	0,0018	0,998
Benzo(k)fluoranteno	3,90	0,0048	0,994
Benzo(a)pireno	6,05	0,0021	0,997
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	7,83	0,0012	0,997
Dibenzo[a,h]antraceno	5,59	0,0020	0,997
Benzo(g,h,i)perileno	5,73	0,0033	0,995

Tabla 19. Resultados de la linealidad y sensibilidad del método Extracción Acelerada con Solvente y cuantificación por GC-MS de HAPs en sedimento.

Analito	Linealidad y sensibilidad		
	Promedio pendiente (n=3) ($\mu\text{g/kg}$)	Desviación estándar σ	Promedio coeficiente de determinación r^2
Naftaleno	3,66	0,0056	0,993
Acenaftileno	4,76	0,0022	0,996
Acenafteno	6,88	0,0021	0,997
Fluoreno	1,79	0,0007	0,998
Fenantreno	2,33	0,0083	0,990
Antraceno	4,89	0,0061	0,990
Fluoranteno	3,43	0,0018	0,996
Pireno	1,43	0,0009	0,998
Benzo[a]antraceno	7,31	0,0042	0,990
Criseno	1,32	0,0007	0,996
Benzo[b]fluoranteno	8,68	0,0084	0,992
Benzo(k)fluoranteno	1,42	0,0039	0,993
Benzo(a)pireno	6,53	0,0086	0,991
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	5,87	0,0041	0,993
Dibenzo[a,h]antraceno	8,20	0,0013	0,997
Benzo(g,h,i)perileno	3,86	0,0011	0,998

3.5.4. Precisión

La precisión del método analítico de HAPs en matriz suelo en término de repetibilidad, expresada como coeficiente de variación porcentual (CVr%) fue menor a 9,87, siendo este valor correspondiente al analito fenantreno; mientras que para reproducibilidad el CVri% fue menor que 11,38, correspondiente al antraceno.

En el caso de sedimento, el acenaftileno obtuvo el mayor valor del coeficiente de variación porcentual (CVr%), siendo 9,77; y dibenzo[a,h]antraceno fue el analito con mayor CVri%, correspondiente a un valor de 11,07. Por tanto, los demás resultados se encuentran bajo dicho valor tanto para repetibilidad como para reproducibilidad.

Para ambos casos se cumple el criterio de aceptabilidad obteniendo valores menores a 9,92 CVr% Horwitz en términos de repetibilidad y para reproducibilidad menor a 12,07 CVri% Horwitz.

Los resultados se detallan en la Tabla 20 para suelo y Tabla 21 para sedimentos.

Tabla 20. Resultados de la precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad del método Extracción Acelerada con Solvente y cuantificación por GC-MS de HAPs en suelo.

Analito	Precisión					
	Repetibilidad ($\mu\text{g/kg}$) (n=10)	Desviación estándar σ	CVr%	Reproducibilidad ($\mu\text{g/kg}$) (n=10)	Desviación estándar σ	CVri%
Nap	207,65	17,89	8,62	442,60	15,16	3,43
Acy	227,08	15,44	6,80	464,51	34,77	7,49
Ace	250,39	10,33	4,13	425,57	33,01	7,76
Flu	255,01	14,88	5,84	445,40	21,02	4,72
Phe	268,77	26,52	9,87	459,79	28,08	6,11
Ant	262,64	18,62	7,09	417,66	47,52	11,38
Flt	256,05	22,39	8,75	432,55	31,86	7,37
Pyr	261,70	9,88	3,78	473,15	15,66	3,31
B[a]A	261,69	6,37	2,43	427,51	27,97	6,54
Chr	269,37	6,97	2,59	463,86	15,54	3,35
B[b]F	254,62	6,97	2,74	423,54	22,05	5,21
B(k)F	276,50	8,64	3,13	466,26	16,02	3,44
B(a)P	261,87	9,29	3,55	457,19	30,23	6,61
I(1,2,3-c,d)P	243,30	15,14	6,23	432,66	24,03	5,56
D[a,h]A	251,00	11,20	4,46	445,77	15,07	3,38
B(g,h,i)P	249,75	17,95	7,19	448,14	17,41	3,89

Tabla 21. Resultados de la precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad del método Extracción Acelerada con Solvente y cuantificación por GC-MS de HAPs en sedimento.

Analito	PRECISIÓN					
	Repetibilidad ($\mu\text{g}/\text{kg}$) (n=10)	Desviación estándar σ	CVr%	Reproducibilidad ($\mu\text{g}/\text{kg}$) (n=10)	Desviación estándar σ	CVri%
Nap	-	-	-	-	-	-
Acy	335,77	32,79	9,77	-	-	-
Ace	360,07	34,31	9,53	-	-	-
Flu	254,97	18,16	7,12	-	-	-
Phe	245,26	14,27	5,82	-	-	-
Ant	187,23	14,14	7,55	-	-	-
Flt	221,48	4,86	2,20	-	-	-
Pyr	238,17	6,48	2,72	480,37	14,56	3,03
B[a]A	198,02	12,72	6,42	343,82	19,52	5,68
Chr	218,56	8,322	3,81	427,44	20,94	4,90
B[b]F	195,70	16,59	8,48	353,66	20,22	5,72
B(k)F	214,65	17,30	8,06	404,05	44,12	10,92
B(a)P	213,49	12,06	5,65	369,31	13,84	3,75
I(1,2,3-c,d)P	224,29	13,55	6,04	422,94	19,17	4,53
D[a,h]A	203,89	10,71	5,26	366,42	40,56	11,07
B(g,h,i)P	202,75	12,43	6,13	387,40	41,88	10,81

Como se observa en los resultados para matriz sedimento (Tabla 21), el naftaleno no se consideró, debido a que en el cromatograma no hubo respuesta para este analito.

Por otro lado, tampoco se registró la cuantificación de HAPs en reproducibilidad para: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno y fluoranteno, debido a que estas especies son cuantificadas con el estándar subrogante Naftaleno D8 y dicho estándar tuvo un error en la preparación de la muestra. Es por esto, que las concentraciones obtenidas sobrepasaron al triple de la concentración fortificada inicialmente.

3.5.5. Veracidad

La veracidad permite ver el rendimiento del método analítico desde la extracción de la muestra hasta el análisis instrumental, a través del grado de concordancia entre los resultados obtenidos y el valor de referencia a la cual fue fortificada la muestra. Se determinó la veracidad a través de la recuperación de una muestra fortificada.

3.5.5.1. Recuperación

Las recuperaciones fueron obtenidas mediante la fortificación de suelo a dos niveles de concentración, 240 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 440 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en el caso de sedimento se fortificó a 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 240 $\mu\text{g}/\text{kg}$; para posteriormente aplicar la metodología diseñada de extracción mediante ASE y cuantificación por GC-MS.

El criterio de aceptación de recuperación depende directamente de la concentración del analito en la cual es fortificada una muestra, aceptado por la AOAC y especificados en la Tabla 5. En este caso, para muestras fortificadas a 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ el $\%R_{\text{teórico}}$ está entre 60 y 115%, mientras que las muestras que fueron fortificadas a 240 y 440 $\mu\text{g}/\text{kg}$ el $\%R_{\text{teórico}}$ se encuentra entre 80 y 110%.

De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 22, para HAPs en suelo fortificados a 240 $\mu\text{g}/\text{kg}$, se obtuvieron valores de recuperaciones entre 93,8% y 110,8%; mientras que para HAPs en suelo fortificados a 440 $\mu\text{g}/\text{kg}$ las recuperaciones estuvieron en un rango de 95,9% a 104,4%.

Las recuperaciones para HAPs en sedimento fortificado a 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$, se encuentran entre 67,9% y 132,7%, mientras que los sedimentos fortificados a 240 $\mu\text{g}/\text{kg}$ se obtuvieron dentro de un rango entre 82,8% y 101,3%. Estos resultados se detallan en la Tabla 23.

En la mayoría de los ensayos se cumple el criterio establecido en el rango de concentración específico, sin embargo, el mayor $\%R$ encontrado a 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en matriz sedimento fue de 132,7% para el analito benzo(a)pireno. Esto se puede explicar por la mayor dispersión de los datos a concentraciones más bajas.

Tabla 22. Resultados de la recuperación del método Extracción Acelerada con Solvente y cuantificación por GC-MS de HAPs en suelo.

Analito	VERACIDAD			
	%Recuperación Promedio (n=3) Nivel 1 240 µg/kg	Desviación estándar σ	%Recuperación Promedio (n=3) Nivel 2 440 µg/kg	Desviación estándar σ
Naftaleno	95,0	3,883	99,9	2,031
Acenaftileno	99,4	1,512	103,4	1,086
Acenafteno	100,0	4,442	98,6	1,962
Fluoreno	101,9	2,237	99,5	0,708
Fenantreno	93,8	4,332	99,9	0,975
Antraceno	100,7	3,967	95,9	2,458
Fluoranteno	100,1	2,757	99,4	0,936
Pireno	104,0	1,640	104,4	2,287
Benzo[a]antraceno	106,3	3,113	98,5	1,067
Criseno	110,5	4,267	101,3	1,603
Benzo[b]fluoranteno	102,9	2,240	99,0	1,796
Benzo(k)fluoranteno	110,8	1,086	102,3	1,18
Benzo(a)pireno	105,1	2,444	100,7	3,114
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	101,0	2,086	100,0	0,888
Dibenzo[a,h]antraceno	101,3	1,875	99,9	1,008
Benzo(g,h,i)perileno	98,3	2,606	100,0	1,022

Tabla 23. Resultados de la recuperación del método Extracción Acelerada con Solvente y cuantificación por GC-MS de HAPs en sedimento.

Analito	VERACIDAD			
	%Recuperación Promedio (n=3) Nivel 1 70 µg/kg	Desviación estándar σ	%Recuperación Promedio (n=3) Nivel 2 240 µg/kg	Desviación estándar σ
Naftaleno	117,8	0,981	-	-
Acenaftileno	-	-	-	-
Acenafteno	91,6	5,418	-	-
Fluoreno	85,8	2,549	99,9	2,962
Fenantreno	67,9	2,917	101,3	2,491
Antraceno	93,5	6,383	82,8	4,226
Fluoranteno	70,4	4,615	94,5	1,711
Pireno	98,5	0,830	101,0	0,443
Benzo[a]antraceno	80,6	3,858	88,3	88,3
Criseno	94,9	3,569	95,0	0,490
Benzo[b]fluoranteno	83,5	0,965	89,1	3,622
Benzo(k)fluoranteno	84,2	6,167	97,1	4,403
Benzo(a)pireno	132,7	6,449	93,9	3,639
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	82,3	4,505	98,8	1,436
Dibenzo[a,h]antraceno	86,5	5,107	88,8	0,988
Benzo(g,h,i)perileno	89,2	1,708	89,7	0,460

3.5.6. Incertidumbre expandida

Se calculó la incertidumbre expandida (U) para cada uno de los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos prioritarios, utilizando los resultados de precisión intermedia del método analítico. Los resultados se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24. Valores de incertidumbre combinada U_c y expandida de método analítico para determinación de HAPs en suelo y cuantificación mediante GC-MS.

Analito	Incertidumbre combinada U_c	Incertidumbre expandida U (Factor de cobertura, k=2)
Naftaleno	0,050	0,100
Acenaftileno	0,082	0,164
Acenafteno	0,084	0,168
Fluoreno	0,055	0,111
Fenantreno	0,076	0,151
Antraceno	0,122	0,245
Fluoranteno	0,085	0,170
Pireno	0,041	0,082
Benzo[a]antraceno	0,071	0,141
Criseno	0,041	0,083
Benzo[b]fluoranteno	0,059	0,117
Benzo(k)fluoranteno	0,041	0,083
Benzo(a)pireno	0,077	0,153
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,071	0,142
Dibenzo[a,h]antraceno	0,038	0,076
Benzo(g,h,i)perileno	0,046	0,091

El resultado, x , deberá ser reportado junto con su incertidumbre (U_x), mostrados en la Ecuación 13:

$$U_x = U \cdot x \quad \text{Ecuación 13}$$

Dónde:

x = Resultado de la muestra

U = Incertidumbre expandida.

Finalmente, el resultado de la muestra junto con su incertidumbre para cada analito depende y varía de la concentración obtenida en la muestra, y se expresa como:

$$\mathbf{Resultado = } x \pm U_x$$

3.6. Análisis de muestras reales

Si bien el análisis de muestras reales no corresponde a un objetivo de este trabajo, estas fueron realizadas con el fin evaluar la metodología y obtener datos sobre el complejo industrial de la bahía de Quintero, pudiendo dar pie para una futura investigación, respecto a las concentraciones encontradas de HAPs en este sector.

Los resultados obtenidos del análisis de HAPs en el muestreo de sedimentos proveniente de la Bahía de Quintero se resumen en la Tabla 25, expresados en $\mu\text{g}/\text{kg}$ en base húmeda, los cuales fueron extraídos utilizando la metodología implementada y validada.

Tabla 25. Concentraciones de HAPs encontradas en los sitios de muestreo.

Analito	SM1	SM2	SM3	SM4	SM5	SM6	SM7	SM8	SM9	SM10
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)									
Nap	<LC	-	-	-	-	102,9	162,7	129,1	117,6	126,5
Acy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flu	80,3	63,4	64,4	66,1	151,5	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC
Phe	303,1	268,1	274,8	420,9	865,3	42,2	83,5	179,9	94,2	90,1
Ant	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flt	<LC	<LC	<LC	<LC	44,8	-	-	<LC	<LC	-
Pyr	<LC	-	-	-	-	<LC	-	<LC	<LC	<LC
B[a]A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chr	-	<LC	<LC	<LC	<LC	-	-	-	-	<LC
B[b]F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B(k)F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B(a)P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I(1,2,3-c,d)P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D[a,h]A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B(g,h,i)P	-	<LC	<LC	-	<LC	-	-	<LC	-	<LC
HAPs Total	383,5	331,6	339,3	487,1	1061,6	145,2	246,2	309,1	211,7	216,6

Los HAPs se encontraron en todos los lugares de muestreo en la bahía de Quintero, pero solo se detectó la presencia de siete analitos de un total de dieciséis estudiados, correspondiente a: naftaleno, fluoreno, fenantreno, fluoranteno, pireno, criseno y benzo(g,h,i)perileno. De estos siete HAPs, el fluoreno y fenantreno se encuentran presente en todos los sitios de muestreo. La mayor concentración detectada de HAPs totales fue de 1061,6 µg/kg, presente en el sitio de muestreo SM5.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos de bajo peso molecular que tienen de 2 a 3 anillos aromáticos como el naftaleno, fluoreno, fenantreno, antraceno y derivados es difícil de encontrar en muestras de suelo o sedimento, debido a la volatilización y degradación microbiana que pueden sufrir, por lo que su presencia en los sitios de muestreo probablemente indique alguna introducción reciente.

En cuanto a los HAPs de alta masa molar (5 o 6 anillos), solo se detectó la presencia benzo[g,h,i]perileno (valor bajo el límite de cuantificación), compuesto que tiende a prevalecer más tiempo. Este hidrocarburo aromático se produce por la combustión incompleta de la materia orgánica.

Evaluar la distribución espacial de HAPs en los sedimentos de la Bahía de Quintero y la identificación de fuentes específicas de contaminación, se ve obstaculizada debido a las concentraciones extremadamente bajas presentes.

IV - CONCLUSIONES

En este trabajo se consiguió el desarrollo de un método adecuado a través de la técnica de extracción acelerada con solvente (ASE) para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en matrices suelo y sedimento, logrando realizar un análisis eficiente y dar respuesta rápida, frente a un derrame o vertimiento de petróleo.

Mediante la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas, se logró obtener en el menor tiempo posible las señales cromatográficas con mayor resolución y reproducibilidad, permitiendo una identificación inequívoca de los distintos HAPs en la complejidad de la matriz de estudio.

El acoplamiento del proceso de limpieza en la extracción ASE y el uso de silica gel es una de las principales ventajas obtenidas del método, ya que permitió aumentar la selectividad de los analitos y por ende, disminuyó las interferencias propias de los componentes de la matriz, además de la disminución del tiempo en la preparación de muestras previas al análisis instrumental.

La aplicación de un diseño factorial para la optimización del método, permitió estudiar los efectos que pueden tener varios factores sobre la recuperación de los analitos desde la matriz. El solvente fue el único parámetro estadísticamente significativo en la extracción para ambas matrices, pero con resultados en diferentes niveles, el cual se explica principalmente por las diferencias en el contenido de humedad y carbono orgánico

presentes en las muestras. Esto llevó a la necesidad de efectuar y validar dos métodos en paralelo para la determinación de HAPs.

El análisis de HAPs en muestras de suelo y sedimentos mediante Extracción Acelerada con Solvente (ASE) resultó ser más rápido en tiempos de extracción, reducción significativa del consumo de solventes y un mayor número de análisis de muestra, en comparación a lo señalado en la literatura sobre el análisis Soxhlet, la extracción con ultrasonidos y otros métodos.

A partir de los resultados obtenidos en la validación en términos de selectividad, linealidad y sensibilidad, límites de detección (LD) y cuantificación (LC), exactitud y precisión para la determinación de cada hidrocarburo aromático policíclico, se logró demostrar que la metodología implementada es apta para el propósito indicado, basados en los criterios definidos por la AOAC.

De esta forma, se demuestra que la extracción acelerada con solvente es una alternativa confiable (frente a métodos normalizados) para ser utilizada como una metodología pericial en el Laboratorio de Química Ambiental del Instituto de Salud Pública de Chile y que frente a eventuales contingencias ambientales se podrá determinar y cuantificar los HAPs presentes en una muestra de suelo o sedimento.

V - RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar el método implementado para la determinación y cuantificación de HAPs en suelos y/o sedimentos, debido a que la técnica de extracción cumple con los fines previstos y frente a eventuales contingencias ambientales, como lo son derrames y vertimientos de petróleo, permitirá analizar y cuantificar una o varias muestras simultáneas en cortos periodos de tiempo, logrando una rápida toma de decisión.

VI - REFERENCIAS

- Agudo, A. (2009). Los Hidrocarburos Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) Acercamiento a su problemática como riesgo laboral. Secretaria de Salud y Medio Ambiente MCA-UGT, pp: 130.
- Andalucia, J. de. (2017). Métodos De Derminación De Compuestos Orgánicos, pp: 104–156.
- C, R. A., Marante, Á., Hardisson, R., & Torre, D. (2006). Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en productos de la pesca. *Revista de Toxicología. Rev.* 23: 1–6.
- Castro Varela, G. (2007). Informe Final Diseño Monitoreo Frente Derrames De Hidrocarburos, pp: 120.
- Cavazos-Arroyo, J., Pérez-Armendáriz, B., & Mauricio-Gutiérrez, A. (2014). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo. Rev.* 11(4): 539–550.
- G., A. A. G., & Franco, V. D. de. (2016). Caracterización y Análisis de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en los sedimentos marinos de la Bahía Manzanillo y su influencia en los procesos de biodegradación. *I+D Tecnológico. Rev.* 12(2): 46–55.
- ITOPF. (2009). Efectos de la Contaminación por Hidrocarburos en el Sector de la Pesca y Agricultura. *Itopf*, pp: 12.
- ITOPF. (2012). Efectos de la contaminación por hidrocarburos en el medio marino. *Itopf*, pp: 12.
- Kettle, A. (2013). Use of Accelerated Solvent Extraction with In-Cell Cleanup to Eliminate Sample Cleanup During Sample Preparation. White Paper 70632 - Thermo Scientific, pp: 1–7.

- Lecaros, O., Juan, R., & Lorenzo, M. (1997). Hidrocarburos alifáticos en sedimentos de fondo marino en el estrecho de Magallanes y canal Beagle. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. Rev. 32(2): 203-213.
- Murphy, B., Lingam, S., Richter, B., & Carlson, R. (2012). Simultaneous Extraction of PAHs and PCBs from Environmental Samples Using Accelerated Solvent Extraction, pp: 1–5.
- Nelson, R. K., Aeppli, C., Arey, J. S., Chen, H., de Oliveira, A. H. B., Eiserbeck, C., ... White, H. W. (2016). Applications of Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography (GC×GC) in Studying the Source, Transport, and Fate of Petroleum Hydrocarbons in the Environment. *Standard Handbook Oil Spill Environmental Forensics*, 2nd Edition, pp: 399-488.
- Organización Marítima Internacional. (2005). Destino de los derrames de hidrocarburos en el medio marino, pp: 9.
- Ortínez Brito, O., Ize Lema, I., & Gavilán García, A. (2007). La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México, (Saval 1995), pp: 83–92.
- Ortiz Salinas, R., Cram, S., & Sommer, I. (2012). Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en suelos de la llanura aluvial baja del estado de Tabasco, México. *Universidad y Ciencia*. Rev. 28(2): 131–144.
- Richter, B. E., & Raynie, D. (2012). Accelerated Solvent Extraction (ASE) and High-Temperature Water Extraction. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists*. Rev. 2: 105-115.
- Rodríguez-Trigo, G., Paul Zock, J., & Isidro Montes, I. (2007). La exposición a las mareas negras y sus efectos en la salud. *Archivos de Bronconeumología*. Rev. 43(11): 628-635.
- Sandoval, S. (2010). Guía Técnica: Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición, "Aspectos generales sobre la validación de métodos". *Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki*, pp: 66.

- Silva Arroyave, S. M., & Correa Restrepo, F. J. (2009). Análisis de la Contaminación del Suelo: Revisión de la Normativa y Posibilidades de la Regulación Económica. *Semestre Económico*, pp: 13–34.
- Soriano-Sanz, J. A. (2009). Contenido en hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en mejillón silvestre de la costa de galicia y cantábrico , antes y después del vertido del b/t prestige, pp: 323.
- The International Tanker Owner Pollution Federation Limited, I. (2011). Efectos de la contaminación por hidrocarburos en las actividades sociales y económicas. Documento de Información Técnica. *Rev. 12*: 1-8.
- Toledo Ocampo, A. (2005). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, pp: 695.
- V. Botello, A., Villanueva, S., Díaz, G., & Pica, Y. (1995). Contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos y organismos del puerto de salina cruz, Oaxaca, México. *Int. Contam. Ambient., Rev. 11*: 21–30.
- Vives, Í., Grimalt, J. O., & Guitart, R. (2001). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana. *Apuntes de Ciencia y Tecnología. Rev. 3*: 45–47.

VII - ANEXOS

Optimización extracción ASE

En la optimización de la extracción ASE se aplicó un diseño factorial con cinco variables: solvente, temperatura, tiempo de extracción estático, volumen de enjuague y tiempo de purga, cada uno elegido con dos niveles: bajo y alto. En la Tabla A1 se detallan los 32 experimentos trabajados en la optimización de la extracción en suelo y sedimento.

Tabla A1. Experimentos trabajados en optimización del método.

Método	Solvente	Temperatura (°C)	Tiempo extracción estático (min)	Volumen de enjuague (%)	Tiempo de purga (s)
1	1:1	100	5	60	160
2	1:1	150	5	60	160
3	1:1	100	10	60	160
4	1:1	150	10	60	160
5	1:1	100	5	80	160
6	1:1	150	5	80	160
7	1:1	100	10	80	160
8	1:1	150	10	80	160
9	1:1	100	5	60	200
10	1:1	150	5	60	200
11	1:1	100	10	60	200
12	1:1	150	10	60	200

13	1:1	100	5	80	200
14	1:1	150	5	80	200
15	1:1	100	10	80	200
16	1:1	150	10	80	200
17	1:9	100	5	60	160
18	1:9	150	5	60	160
19	1:9	100	10	60	160
20	1:9	150	10	60	160
21	1:9	100	5	80	160
22	1:9	150	5	80	160
23	1:9	100	10	80	160
24	1:9	150	10	80	160
25	1:9	100	5	60	200
26	1:9	150	5	60	200
27	1:9	100	10	60	200
28	1:9	150	10	60	200
29	1:9	100	5	80	200
30	1:9	150	5	80	200
31	1:9	100	10	80	200
32	1:9	150	10	80	200

Cálculos para determinar propiedades analíticas

Los resultados obtenidos en la validación del método para cada una de las propiedades analíticas fueron calculados a través de fórmulas, detalladas en la introducción. A continuación, se muestra un ejemplo de ello utilizando el analito pireno en matriz suelo.

a) Límites de detección y cuantificación

Se fortificaron 10 muestras en matriz a una concentración de 70 µg/kg el mismo día y se realizó extracción mediante ASE y cuantificación por GC-MS. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla A2. A partir de esto, se determinó el promedio, desviación estándar, límite de detección, límite de cuantificación y la razón de conformidad para pireno.

Tabla A2. Resultados del límite de detección y cuantificación en la validación del método analítico para pireno en suelo.

N° muestra	Concentración (µg/kg)	
1	76,23	Promedio: 74,37 µg/kg Desviación estándar: 4,68 µg/kg Límite de detección: 15,39 µg/kg Límite de cuantificación: 46,79 µg/kg Razón de conformidad: 4,5
2	77,99	
3	69,55	
4	84,03	
5	75,53	
6	75,59	
7	73,27	
8	68,31	
9	73,62	
10	69,62	

b) Linealidad y sensibilidad

Para evaluar la linealidad y sensibilidad se elaboró 3 curvas de trabajo en matriz, día por medio, con seis puntos de calibración para HAPs (Tabla 10). Luego de la determinación instrumental, el GC-MS arrojó el valor de la pendiente (m) y el coeficiente de determinación (r^2) para cada una, mostrados en la Tabla A3. Con ello, se obtuvo promedio de pendientes, desviación estándar de las mismas, promedio del coeficiente de determinación y la evaluación de la linealidad a través del criterio: *Promedio $r^2 > 0,98$* .

Tabla A3. Resultados de la linealidad y sensibilidad en la validación del método analítico para pireno en suelo.

Curva de calibración	Valor pendiente (m)	Valor coeficiente de determinación (r^2)	Promedio m:	1,13
1	1,21	0,9984	Desviación estándar:	0,0013
2	1,09	1,0000	Promedio r^2 :	0,999
3	1,09	0,9975	Evaluación linealidad:	0,999 > 0,98

c) Precisión

La precisión en términos de repetibilidad se determinó mediante la fortificación de 10 muestras en matriz suelo a una concentración de 240 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En la Tabla A4 se muestran los resultados. Con ello se obtuvo el promedio, desviación estándar y el coeficiente de variación (CVr %), el cual se comparó con el coeficiente de variación de Horwitz, calculado a partir de la concentración a la cual fue fortificada la muestra (Ecuación 5).

Tabla A4. Resultados de la precisión en términos de repetibilidad en la validación del método analítico para pireno en suelo.

N° muestra	Valor obtenido (µg/kg)	
1	249,45	
2	256,82	
3	265,48	Promedio (n=10): 261,70
4	266,68	Desviación estándar: 9,88
5	245,90	CVr%: 3,78
6	253,76	CVr% horwitz: 9,92
7	271,80	Evaluación: 3,78 ≤ 9,92
8	271,61	
9	274,05	
10	261,40	

La precisión evaluada en término de reproducibilidad, se realizó mediante la fortificación de 10 muestras a una concentración de 440 µg/kg, en días distintos. La cuantificación del pireno en las muestras, permitió comparar el coeficiente de variación (CVri%) y el coeficiente de variación de Horwitz (CVri % horwitz), con el fin de determinar si se cumple el criterio establecido. Los resultados se detallan en la Tabla A5.

Tabla A5. Resultados de la precisión en términos de reproducibilidad en la validación del método analítico para pireno en suelo.

N° muestra	Valor obtenido (µg/kg)	
1	458,68	
2	479,44	
3	462,19	Promedio (n=10): 473,15
4	449,89	Desviación estándar: 15,66
5	463,39	CVri %: 3,31
6	491,58	CVri % horwitz: 12,07
7	500,89	Evaluación: 3,31 ≤ 12,07
8	469,96	
9	473,200	
10	482,240	

d) Recuperación

La recuperación se obtuvo mediante la fortificación de 6 muestras a dos niveles de concentración, 240 µg/kg y 440 µg/kg. El criterio de aceptación depende directamente de la concentración a la cual fue fortificada la muestra, aceptado por la AOAC y especificados en la Tabla 5. En este caso, para las concentraciones trabajadas el %R_{teórico} se encuentra entre 80% y 110%. Los resultados se muestran en la Tabla A6.

Tabla A6. Resultados de la recuperación en la validación del método analítico para pireno en suelo.


Día	N° muestra	Valor obtenido (µg/kg)	
1	1	249,45	%R _{promedio} 104,0 Evaluación 80% < 104% < 110%
	2	245,90	
	3	253,76	
2	4	449,89	%R _{promedio} 104,4 Evaluación 80% < 104,4% < 110%
	5	458,68	
	6	469,96	

Junto con el trabajo realizado, se redactaron los siguientes documentos para fines de uso interno en el Instituto de Salud Pública de Chile:

- Instructivo de uso del Extractor Acelerado con Solvente (ASE) 350.
- Protocolo a seguir del método analítico implementado, denominado “Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos y sedimentos mediante extracción acelerada con solvente (ASE) y cuantificación por cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MS)”

En el presente, se adjunta la portada de cada uno de estos documentos.

Se incluye el resumen y la presentación en modalidad poster del método analítico para suelo, que fue presentado en el XIII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo, realizado en la Pontificia Universidad Católica de Chile en noviembre de 2017.

	EXTRACTOR ACELERADO CON SOLVENTE (ASE) 350	Emisión: XX-XX-XXXX
		VERSIÓN: X
		Actualización: XX-XX-XXXX
Sección Química Ambiental	IT-XXX.XX-XXX	Pág. 1 de 7

1. OBJETIVOS

Establecer el uso correcto en la operación del equipo Extractor Acelerado de Solventes (ASE 350). Dirigido a usuarios que posean las competencias necesarias.

2. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS


- Celdas de extracción (34 mL y 66 mL).
- Viales 60 mL
- Frascos de recogida 250 mL
- Frasco Schott 2 L
- Filtro de nitrocelulosa
- Gas Nitrógeno

3. DESARROLLO

3.1 Descripción general del equipo



Figura 1. Extractor Acelerado de Solventes (ASE 350).

	DETERMINACION DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN SUELOS Y SEDIMENTOS MEDIANTE EXTRACCIÓN ACELERA CON SOLVENTES (ASE) Y CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS (GC-MS)	Emisión: XX-XX-XXXX
		Versión: 1
		Actualización: XX-XX-XXXX
Sección Química Ambiental	ME-XXX.XX-XX	Página 107 de 128

1. OBJETIVO

Determinar y cuantificar Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en suelo y sedimento mediante extracción acelerada con solvente (ASE) y cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MSD).

2. CAMPO DE APLICACIÓN Y ALCANCE

Este procedimiento es aplicable a muestras sólidas y semisólidas; húmedas o secas.

3. FUNDAMENTO

Una cantidad determinada de muestra es sometida a extracción acelerada con solvente, donde la interacción entre la matriz y el solvente a altas presiones y temperatura, permite una extracción eficaz de los analitos de interés. El extracto obtenido es concentrado e introducido dentro del cromatógrafo gaseoso y separado a través de una columna analítica para ser analizado por un detector selectivo de masas.

4. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

- 4.1 (Richter y Raynie, 2012). 06 Accelerated Solvent Extraction (ASE) and High-Temperature Water Extraction. Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists. Rev. 2: 105-115.
- 4.2 (Taylor y Francis, 2012). Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the Analysis of Environmental Solid Samples – Some Aspects of Theory and Practice. Vol 31(3), 149-165.
- 4.3 (Osman, 2008). Selective Accelerated Solvent Extraction for the analysis of soil polycyclic aromatic hydrocarbons and sterols. Vol 12(2), 352–356.



XIII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo
1era Reunión de Materia Orgánica

Suelo y Sustentabilidad

Santiago, Chile, 20-23 de noviembre de 2017

DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN SUELOS MEDIANTE EXTRACCIÓN ACELERADA CON SOLVENTE (ASE) Y CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS (GC-MS)

MOLINA, M.¹; VERA, J. ¹⁻²; ARAYA, M. ²

¹ Universidad de Chile, Facultad de Ciencias;

² Instituto de Salud Pública de Chile, Subdepartamento de Ambiente, Sección Química Ambiental.

* Autor de contacto: mariana.molinatapia@gmail.com; Marathon 1000, Ñuñoa, Santiago, Chile.

Los contaminantes y su repercusión en los ecosistemas han sido una de las grandes problemáticas ambientales a nivel mundial. Debido a derrames de petróleo, los hidrocarburos son contaminantes considerados prioritarios por la USEPA y alteran directamente las propiedades químicas del suelo, generando consecuencias de tipo económico, social y de salud pública. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son derivados del petróleo y se caracterizan por ser su fracción más tóxica, por lo tanto, las características que hacen importante su estudio son la bioacumulación, persistencia y alto potencial tóxico y carcinógeno. En este trabajo se exponen los resultados de optimización y validación de un método para cuantificar HAPs presentes en suelos. La extracción de los hidrocarburos desde la matriz previamente fortificada, se basó en la técnica de extracción acelerada con solvente (ASE), donde se estudió la influencia de cinco parámetros mediante un diseño factorial con dos niveles, para luego ser cuantificados mediante GC-MSD. Los resultados de la optimización fueron: temperatura 100°C, acetona-diclorometano (1:1, v/v), 5 min tiempo de extracción estático, tiempo de purga 160 s y volumen de enjuague 60%. La validación se verificó en el rango de trabajo 50-630 µg/kg con un $r^2 > 0,98$; los límites de detección (LD) 6,4 – 15,8 µg/kg, mientras el límite de cuantificación (LC) 19,5 – 47,9 µg/kg; la precisión del método en término de repetibilidad expresada como CV% fue menor que 8,3, mientras que para reproducibilidad fue menor que 11,3. Finalmente, la recuperación de HAPs se encuentra entre 95-109%. La eficacia del sistema ASE permite mejores recuperaciones en cortos periodos de tiempo y reduce la cantidad de disolvente, con respecto a otras técnicas convencionales (Soxhlet). Por lo tanto, la investigación es de gran importancia ya que el método desarrollado permitirá cuantificar bajas concentraciones de HAPs en suelo de manera más eficiente frente a una contingencia ambiental.

PALABRAS CLAVE: Extracción acelerada con solvente (ASE), suelo, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).

DETERMINACIÓN DE HAPs EN SUELOS MEDIANTE EXTRACCIÓN ACCELERADA CON SOLVENTE (ASE) Y CUANTIFICACIÓN POR GC-MSD

"DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN SOILS BY ACCELERATED EXTRACTION WITH SOLVENT (ASE) AND QUANTIFICATION BY GAS CHROMATOGRAPHY WITH SELECTIVE MASS DETECTOR (GC-MSD)"

Molina, M.¹, Vera, J.^{1,2}, Araya, M.², Copaja, S.¹

¹Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. ²Sección Química Ambiental, Subdepartamento de Ambiente, Instituto de Salud Pública de Chile. Correo: mariana.molinatapia@gmail.com

1. INTRODUCCION

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son compuestos orgánicos formados por dos o más anillos de benceno fusionados, los cuales difieren en el número y posición del anillo aromático. En la naturaleza, los HAPs son producidos por la diagénesis de la materia orgánica a bajas temperaturas durante la formación de petróleo y carbón, por combustión incompleta de la materia orgánica (pírolisis) y por biosíntesis. En el ambiente, los HAPs como derivados del petróleo son liberados al ambiente por actividades antropogénicas, por lo que se encuentran en todos los compartimentos ambientales siendo el suelo una de las matrices más afectadas. La presencia de HAPs altera el proceso biológico de los suelos, lo que varía en función de las propiedades fisicoquímicas del contaminante y de las características del medio como: permeabilidad, tamaño de partículas, contenido de humedad y de materia orgánica. Además, por su alto potencial tóxico y efectos carcinógenos son considerados contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) y generan consecuencias de tipo social, económico y de salud pública. El objetivo de este trabajo es optimizar y validar un método analítico para cuantificar 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos mediante la técnica de extracción acelerada con solvente (ASE) y cuantificación por cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MSD), de manera más eficiente frente a una contingencia ambiental.



2. METODOLOGÍA

Optimización metodología ASE

2.1 Preparación de la muestra

- 10 g de suelo (arcilloso arenoso)
- Solución multiestandar de HAPs de 157 µg/kg
- Agitación por 24 hrs

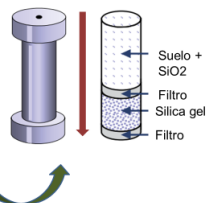
Fortificación

Agente desecante

- Se agregó 2,5 g tierra de diatomeas
- Agitación durante 30 min

Disposición celda de extracción

- Se masó 15 g de sílica gel



2.2 Optimización de la extracción

La optimización se realizó mediante un diseño factorial (2⁵) que permitió analizar los efectos de diversas condiciones tales como: solvente, temperatura, tiempo de extracción estático, volumen de enjuague y tiempo de purga, al mismo tiempo, permitiendo estudiar las interacciones. La evaluación de los resultados se realizó a través de un Diagrama de Pareto de Efectos Estandarizados (Figura 2a), que permitió identificar los factores que tienen una influencia estadísticamente significativa sobre la recuperación de los analitos de interés; y la gráfica de efectos principales (Figura 2b), se interpretó en qué nivel es significativo dicho factor.



Figura 1.- Metodología método analítico.

3. RESULTADOS

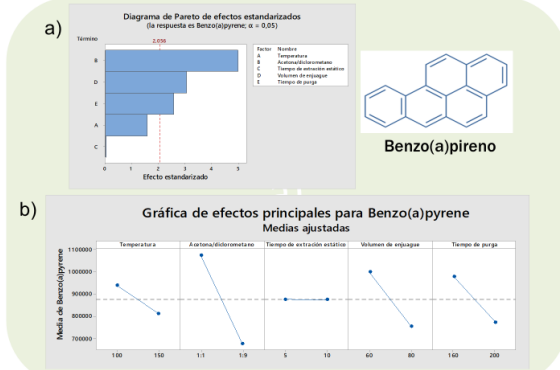


Figura 2.- a) Diagrama de Pareto de Efectos Estandarizados para benzo(a)pireno. b) Gráfica de efectos principales para benzo(a)pireno. Software OriginLab 8.5.

3.1. Caracterización de HAPs

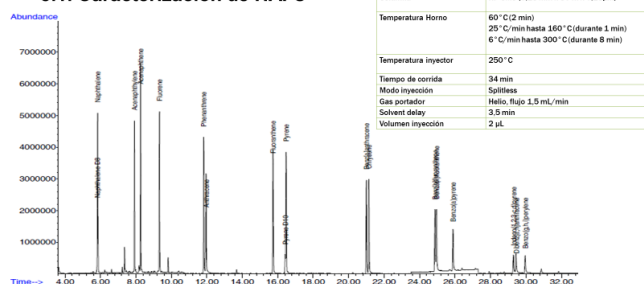
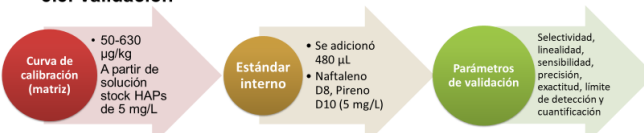


Figura 3.- Cromatograma caracterización 16 HAPs en matriz suelo.

3.2. Resultados metodología ASE

El diagrama de Pareto (Figura 2a) mostró 3 factores estadísticamente significativos que influyen sobre la recuperación (nivel de confianza del 95%, $\alpha = 0,05$). Los resultados de los factores significativos son: acetona-diclorometano (1:1, v/v), volumen de enjuague de 60% y tiempo de purga 160 s. Si bien, la temperatura y el tiempo de extracción estático no presenta significancia, la gráfica de efectos principales (2b) muestra la tendencia de 100°C y 5 min, respectivamente.

3.3. Validación



A partir de condiciones logradas se realizó la validación de la metodología. El rango de trabajo obtenido fue de 50 a 630 µg/kg con un $r^2 > 0,98$, el límite de detección (LD) fue entre 6,4 - 15,8 µg/kg, mientras que el límite de cuantificación (LC) fue 19,5 - 47,9 µg/kg; la precisión del método en término de repetibilidad expresada como CV% fue menor que 8,3 y para reproducibilidad fue menor que 11,3. Finalmente, la recuperación de HAPs se encuentra entre 95-109%.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La eficacia del sistema ASE permite mejores recuperaciones en cortos periodos de tiempo al tener una etapa de clean up (limpieza) y filtración; y reduce la cantidad de disolvente, con respecto a otras técnicas convencionales como Soxhlet (EPA M 3540) y la extracción microonda (EPA M3546). Por lo tanto, la investigación es de gran importancia ya que el método desarrollado logra cuantificar bajas concentraciones de HAPs en suelo de manera más eficiente frente a una contingencia ambiental.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Richter y Raynie (2012). Accelerated Solvent Extraction (ASE) and High-Temperature Water Extraction. Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists (Vol. 2).
 Osman (2008). Selective accelerated solvent extraction for the analysis of soil polycyclic aromatic hydrocarbons and, 12(2), 352-356.

Agradecimientos a la Sección Química Ambiental del Instituto de Salud Pública de Chile