

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**“DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS
POLICÍCLICOS EN AGUAS, POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA
(SPE), EMPLEANDO HPLC ASOCIADO A DETECTOR UV-VISIBLE
Y FLUORESCENCIA EN LÍNEA”**

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

Químico Ambiental

Carolina Marlén Bernal Davis

Director Seminario: Lab. Qco. Enrique Villarroel R.

Profesor Patrocinante: M. Cs. Sylvia Copaja C.

Agosto de 2012

Santiago - Chile

UCH-FC
Q. ambiental
B517
C-1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN DE 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 la candidata:

Carolina Marlén Bernal Davis

“DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN AGUAS, POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE), EMPLEANDO HPLC ASOCIADO A DETECTOR UV-VISIBLE Y FLUORESCENCIA EN LÍNEA”

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

COMISIÓN DE EVALUACIÓN

Qco. Lab. Enrique Villarroel R.
Director de Seminario

M. Cs. Sylvia Copaja C.
Profesor Patrocinante

Prof. María Inés Toral P.
Corrector

Dra. Isele Cortés N.
Corrector

[Signature]

[Signature]

[Signature]

[Signature]

Reseña



Nací el 22 de julio de 1986, en Santiago en la comuna de San Miguel, hija de Pedro y Nancy. Mi primer colegio fue el "Santa Ana" hasta 3° básico y luego me cambié al colegio "Santa Rosa, hermanas de la providencia" donde estuve hasta mi graduación de 4° medio. En el año 2005 di por primera vez la PSU indecisa con las opciones de carrera, así que realice un Preuniversitario ese año para prepararme mejor y aclarar mis dudas. En el año 2006 entre a la Universidad de Chile a la carrera de Química Ambiental, aún no muy convencida de mi decisión, pero claramente con el pasar de los años de he dado cuenta que fue la correcta. En el año 2011 entre a realizar mi Seminario de Título a "ANAM S.A" y hoy en día me encuentro trabajando en "Consultora GeoAmbiental"

Dedicatoria



Gracias a mi mamá y mi papí...



Agradecimientos

A mis padres Pedro y Nancy, por darme la vida, quererme mucho, creer en mí, incluso más de lo que yo misma lo hago, porque siempre me apoyaron en todo y sin ustedes esto hubiese sido imposible.

Mi "yoya" (abuela) por quererme y soportarme en los mejores y peores momentos de mi vida, a mi "tata" Juan por quererme incondicionalmente, y a mis abuelos María y Pedro (QEPD), que estén donde estén, siempre me han acompañado, esto también se lo debo a ustedes.

Mi hermano Bastián, primos Valeria y Felipe por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho.

Mi tía y amiga incondicional Marlén, a mi tío Guillermo y a mi tía Jeannette, gracias por todo.

Martín, mi ahijado hermoso, que me emociona y alegra día a día con su sola presencia.

Todos mis amigos, María José, Andrea, Carlos, Rodrigo, Berny por compartir los buenos y duros momentos de la vida universitaria, sobre todo a ti Cota, que fuiste mi mejor amiga desde el primer día y espero que así sea hasta el último.

A Luis, por ser una persona clave en todo éste proceso universitario desde el primer día, por todas esas conversaciones y enseñanzas que siempre recordare.

A todos mis amigos de ANAM, sobre todo a Cristián, Manuel, Marco, Paty, Carlos y los Sebas, por hacer que mi "práctica" haya sido una experiencia fantástica.

A mis profesores, sobre todo a mi profesora Sylvia, por enseñarme a querer y respetar mi carrera, y a Enrique de ANAM que fue como un profesor para mí.

Y a todos aquellos familiares y amigos que no recordé al momento de escribir esto.

INDICE DE CONTENIDOS	pág.
❖ Reseña	iii
❖ Dedicatoria	iv
❖ Agradecimientos	v
❖ Índice de Tablas	ix
❖ Índice de Figuras	xi
❖ Listado de Abreviaturas	xii
❖ Resumen	xiii
❖ Abstract	xiv
❖ I. INTRODUCCIÓN	1
• 1. Marco Teórico	1
• 1.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	1
• 1.2 Formación de los HAPs	2
• 1.3 Propiedades Físicas y Químicas de los HAPs	3
• 1.4 Fuentes de Emisión	7
• 1.4.1 Fuentes Naturales	7
• 1.4.2 Fuentes Antropogénicas	8
• 1.4.2.1 Calefacciones Domésticas	8
• 1.4.2.2 Vehículos de motor	8
• 1.4.2.3 Usos Industriales	9
• 1.4.2.4 El tabaco y los alimentos	9
• 1.4.3 Fuentes de Combustión	10
• 1.4.3.1 Combustión Estacionaria	10
• 1.4.3.2 Combustión móvil	10
• 1.5 Formas y niveles de exposición a los HAPs	11
• 1.5.1 Exposición Ambiental	11
• 1.5.2 Exposición por humo de Tabaco	11
• 1.5.3 Exposición por la Dieta	12
• 1.5.4 Exposición Ocupacional	12
• 1.5.5 Niveles de referencia en la exposición ocupacional	13
• 1.6 Degradación de los HAPs	14

• 1.7 Efectos sobre la Salud	15
• 1.7.1 Absorción y metabolismo de los HAPs	16
• 1.7.2 Los HAPs como causa de cáncer	19
• 1.7.3 Clasificación de HAPs como cancerígenos.	20
• 1.7.4 Clasificación de la IARC para los HAPs.	21
• 1.8 Normativa	22
• 1.8.1 Concentraciones en algunas ciudades	26
• 2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	27
• 2.1 Sistema de Detección	28
• 3. Metodología de Extracción	29
• 3.1 Extracción en Fase Sólida (SPE)	30
• 3.1.1 Adsorbente de Extracción en Fase Sólida	31
• 3.2 Extracción Líquido-Líquido, EPA 3510	35
❖ Hipótesis	36
❖ Objetivo General	37
❖ Objetivos Específicos	37
❖ II. MATERIALES Y MÉTODOS	38
• 1. Materiales	38
• 1.1 Equipos	38
• 1.2 Instrumentación	38
• 1.3 Reactivos	39
• 1.4 Softwares	39
• 2. Procedimiento del método	40
• 2.1 Soluciones de trabajo	40
• 2.2 Protocolo de preparación de las muestras	41
• 2.3 Parámetros operacionales	45
• 2.3.1 Resumen de condiciones instrumentales	46
❖ III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
• 1. Método Cromatográfico	47
• 2. Curvas de Calibración obtenidas	53
• 3. Análisis Estadístico	55

• 3.1 Cálculo de Límite de detección del método	55
• 3.2 Cálculo de Límite de cuantificación del método	56
• 3.3 Razón de Conformidad	57
• 3.4 Cálculo de precisión del método	57
• 3.5 Cálculo de exactitud del método	58
• 4. Comparación de dos métodos de extracción	66
❖ IV. CONCLUSIONES	70
❖ V. REFERENCIAS	72
❖ VI. ANEXOS:	76
• Anexo 1: Curvas de Calibración	77
• Anexo 2: Manual SISS, Agua Potable, Verificación de desempeño de Métodos de ensayo para el análisis Físico-Químico de parámetros de Calidad de Agua Potable.	92
• Anexo 3: Estadígrafo t de student	100

INDICE DE TABLAS

• Tabla 1: Nombre y características físico-químicas de los 16 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos que serán estudiados.	4
• Tabla 2: Afinidad de una sustancia por los tejidos grasos en función del valor del logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua	5
• Tabla 3: Comparación de instituciones y sus rangos permisibles de HAPs en exposición ocupacional.	13
• Tabla 4: Clasificación de la IARC para sustancias cancerígenas.	20
• Tabla 5: Clasificación de la IARC para los HAPs.	21
• Tabla 6: Límites de Calidad de aguas de consumo y naturales de organismos internacionales frente a HAPs totales y B[a]pyr.	23
• Tabla 7: Adsorbentes más comunes en SPE.	33
• Tabla 8: Métodos para extracción de compuestos orgánicos semivolátiles y no volátiles.	35
• Tabla 9: Volúmenes y concentraciones utilizadas para realizar la curva de calibración.	40
• Tabla 10: Resumen de Gradiente Binario de la fase móvil.	46
• Tabla 11: Tiempos de retención obtenidos para los dos detectores utilizados UV-Visible y Fluorescencia.	50
• Tabla 12: Concentraciones obtenidas de la curva de calibración.	52
• Tabla 13: Tratamiento estadístico del método, para análisis por Detector UV-Visible.	58

- Tabla 14: Tratamiento estadístico del método, para análisis por detector de Fluorescencia. 60
- Tabla 15: Exactitud del método, a través del porcentajes de recuperación de todos los HAPs para una concentración de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en ambos detectores. 62
- Tabla 16: Tratamiento estadístico del método, resultados para Límites de Detección y Límite de Cuantificación para detector UV-Visible y Fluorescencia. 63
- Tabla 17: Comparación de Límite de detección y cuantificación de técnica Extracción líquido-líquido y técnica extracción en fase sólida. 66

INDICE DE FIGURAS

• Fig. 1: Estructura de los 16 HAPs que serán estudiados.	3
• Fig.2: Ruta metabólica del Benzo(a)pireno.	17
• Fig. 3: Proceso de solubilización de Benzo(a)pireno.	18
• Fig. 4. Distintos formatos de SPE: Jeringa, Cartucho y Discos.	32
• Fig. 5. Esquema de preparación de muestra mediante SPE.	33
• Fig. 6: Equipo de extracción al vacío, Empore.	39
• Fig. 7: Diagrama de flujo, procedimiento SPE.	44
• Fig. 8: Gráfico de Gradiente de Fase móvil.	45
• Fig. 9: Cromatograma del estándar de HAPs, con detector UV-Visible.	48
• Fig. 10: Cromatograma del estándar de HAPs, con detector de Fluorescencia.	49
• Fig. 11: Cromatograma de muestra real analizada con detector UV-visible.	51
• Fig. 12: Cromatograma de muestra real analizada con detector De Fluorescencia.	51
• Fig. 13: Curva de Calibración del Acenafteno.	53
• Fig. 14: Gráfico de comparación para límite de detección en técnica extracción en fase sólida y extracción líquido-líquido.	67

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- B[a]Pyr: Benzo[a]pireno
- ELL: Extracción líquido líquido
- HAPs: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.
- IARC: International Agency for Research on Cancer
- Kow: Coeficiente de partición octanol/agua.
- NIOSH: National Institute of Occupational Safety & Health.
- SISS: Superintendencia de Servicios Sanitarios.
- SPE: Extracción en fase sólida.
- UNT: Unidades Nefelométricas de turbidez

RESUMEN

Debido a sus propiedades carcinogénicas y mutagénicas los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) han sido estudiados ampliamente. La determinación de los HAPs en aguas requieren de métodos adecuados para su extracción, identificación y cuantificación, ya que por lo general se encuentran en concentraciones trazas. El procedimiento estándar para la concentración de las muestras dado por el método EPA 8310, extracción líquido-líquido (ELL), pero tiene el inconveniente de consumir mucho tiempo en su preparación y requiere un elevado volumen de solventes antes del análisis instrumental por HPLC. El método estándar (ELL) se comparó con una técnica alternativa, la extracción en fase sólida (SPE), siendo aplicado a aguas potables y naturales. La extracción en fase sólida, se realizó utilizando discos comerciales C18 Empore 3M, con diclorometano como solvente de elución. La identificación de los HAPs se realizó comparando los tiempos de retención con estándares y la cuantificación se llevó a cabo mediante curva de calibración empleando el método de estándar externo. Los límites de detección generados fueron comparados con los obtenidos con el método estándar (ELL). El límite de cuantificación promedio con la técnica propuesta fue de 0,16 µg/L a diferencia de los 0,43 µg/L obtenidos mediante ELL. Los límites obtenidos permiten garantizar la detección de estos HAPs según los requerimiento internacionales (UE). El método SPE utilizando los discos de extracción Empore presentan ventajas comparativas con respecto a los procedimientos de extracción convencional, ya que se obtienen extractos libres de interferencias, se procesan un mayor número de muestras, además de algo muy importante, la reducción considerable, de más de un 70% de volumen de solventes por muestra.

ABSTRACT

By their carcinogenic and mutagenic properties, the Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) have been widely studied. The determination of PAHs in waters require appropriate methods for extraction, identification and quantification, as usually found in trace concentrations. The standard procedure for the concentration of the samples given by EPA Method 8310, liquid-liquid extraction (ELL), but has the drawback of very time consuming in their preparation and require a large volume of solvent before instrumental analysis by HPLC. The standard method (ELL) was compared with an alternative technique, solid phase extraction (SPE), being applied to drinking water and natural. The solid phase extraction was performed using commercial discs C18, 3M Empore, with dichloromethane as elution solvent. The identification of PAHs was performed by comparing the retention times and quantification standards is made with a calibration curve using the external standard method. The detection limits generated were compared with those obtained with the standard method (ELL). The mean limit quantification with the technique proposed was 0.16 µg/L as opposed to 0.43 µg/L obtained from ELL. The limits obtained permit guarantee detection of these PAHs requirement according to international (EU). SPE method using Empore extraction disks have advantages over conventional extraction procedures as free extracts are obtained interference, a higher number of processed samples, besides very importantly, the significant reduction of more of a 70% volume of solvent per sample.

I. INTRODUCCIÓN

1. Marco Teórico

1.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) constituyen un grupo variado de compuestos orgánicos que contienen dos o más anillos aromáticos condensados, formados por átomos de carbono e hidrógeno. Los HAPs son compuestos que se forman durante la incineración incompleta de carbón, petróleo, gas, madera, basura y otras sustancias orgánicas, como tabaco y carne asada, Los HAPs se encuentran en todo el medio ambiente en el aire, el agua y el suelo (Jaramillo, 1993). Como sustancias químicas puras, los HAPs existen generalmente como sólidos incoloros, blancos o verdes amarillosos pálidos y tienen un olor leve agradable (ATSDR, 1995).

El benceno es un hidrocarburo de fórmula molecular C_6H_6 , con forma de anillo, conocido como anillo bencénico o aromático. El hecho de estar compuestos fundamentalmente por carbono e hidrógeno es el origen del nombre "hidrocarburos". Por otra parte, de forma coloquial se conoce que el benceno tiene un olor característico, lo que hace por extensión que todos los compuestos derivados del anillo bencénico se denominen "aromáticos". Finalmente, el hecho de que la mayoría de estos compuestos posean varios anillos les otorga su carácter de "policíclicos".

Los HAPs entran al medio ambiente principalmente a través de las emisiones al aire de los volcanes, los incendios forestales, la quema de madera en los hogares y los gases de los tubos de escape de fuentes móviles. También pueden entrar a las aguas de superficie a través de las descargas de las plantas industriales y las plantas de tratamiento de aguas residuales.

1.2 Formación de los HAPs

Los HAPs se forman durante la combustión incompleta de materia orgánica en general, formada por carbono e hidrógeno al reaccionar con poco oxígeno. Una combustión normal forma dióxido de carbono y agua. Sin embargo, si no hay suficiente oxígeno, la combustión es incompleta; parte del combustible no reacciona completamente y se forman otros subproductos tales como monóxido de carbono y HAPs. Este proceso también es conocido como pirólisis.

Los perfiles de HAPs resultantes de la quema de diversos materiales orgánicos dependen de la temperatura de combustión, duración del proceso, las condiciones de la flama y del tipo de material orgánico. A temperaturas por debajo de 700°C los productos de combustión forman HAPs con varias alquilaciones. Un ejemplo típico es el humo del cigarro que produce hollín con altos contenidos de HAPs alquilados (Bjorseth & Ramdahl 1985). A altas temperaturas, sobre 2000°C sólo se forman HAPs simples sin alquilaciones (Blumer & Youngblood 1975).

Muchos procesos de carbonización producen HAPs durante la degradación de material orgánico a bajas temperaturas (menos de 200°C) y a altas presiones en un período de millones de años como es el petróleo y el carbón (Prince & Drake 1999), por lo que el crudo y sus derivados representan la fuente principal de HAPs en el ambiente en zonas de explotación petroleras y en las ciudades.

1.3 Propiedades físicas y químicas

En general al hablar de HAPs se refiere a compuestos formados exclusivamente por carbono e hidrógeno, como se pueden observar en la Figura 1.

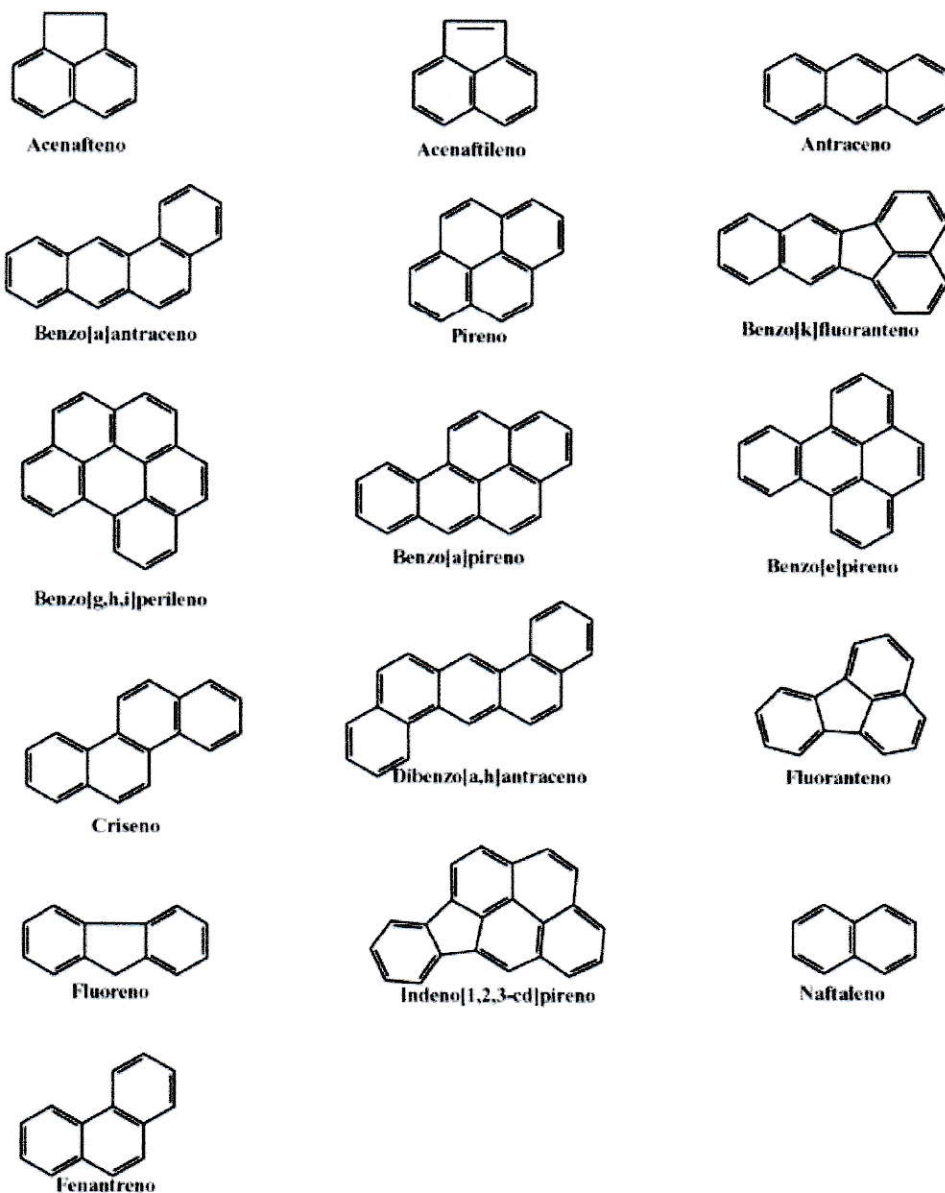


Figura 1: Estructura de los 16 HAPs que serán estudiados.

Los HAPs son compuestos no polares o muy débilmente polares que tienen afinidad por las fases orgánicas hidrofóbicas, presentando una baja solubilidad en el agua (McBride 1994).

Tabla 1: Nombre y características físico-químicas de los 16 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos que serán estudiados.

Nombre HAP	Abreviatura	M.M. (g/mol)	Presión de vapor(Pa)	Octanol/agua (Kow)
Naftaleno	N	128,2	11,0	3,37
Acenaftileno	Acy	152,2	3,86	4,07
Acenafteno	Ace	154,2	$6,0 \cdot 10^{-1}$	3,98
Fluoreno	F	166,2	$4,2 \cdot 10^{-2}$	4,18
Fenantreno	P	178,2	$9,1 \cdot 10^{-2}$	4,45
Antraceno	Ant	178,2	$2,3 \cdot 10^{-3}$	4,45
Pireno	Pyr	202,3	$3,3 \cdot 10^{-4}$	4,88
Fluoranteno	Fl	202,3	$6,7 \cdot 10^{-4}$	4,90
Criseno	Chr	228,3	$8,4 \cdot 10^{-5}$	5,56
Benzo(a)antraceno	B(a)Ant	228,3	$2,9 \cdot 10^{-6}$	5,61
Benzo(b)Fluoranteno	B(b)Fl	252,3	$6,7 \cdot 10^{-5}$	6,04
Benzo(k)Fluoranteno	B(k)Fl	252,3	$1,3 \cdot 10^{-8}$	6,06
Benzo(a)pireno	B(a)Pyr	252,3	$7,5 \cdot 10^{-7}$	6,06
Benzo(g,h,i)perileno	B(ghi)Per	276,3	$1,4 \cdot 10^{-8}$	6,50
Dibenzo(a,h)antraceno	DiB(ah)Ant	278,4	$1,3 \cdot 10^{-8}$	6,84
Indeno(1,2,3-cd)Pireno	lpyr	276,0	$1,3 \cdot 10^{-4}$	6,58

En relación al coeficiente de distribución entre el octanol y el agua (Kow) todos los compuestos tienen un coeficiente mayor a 3 lo que indica una baja solubilidad, inmovilidad, bajas tasas de biodegradación, tendencia a acumularse y a ser persistente. Valores para otros compuestos se pueden encontrar en la base de datos de Sangster Research Laboratories, para tener una estimación de este valor, se puede utilizar el método QSAR (relación cuantitativa estructura-actividad). En la tabla 2 se observa la afinidad de una sustancia por los tejidos grasos (abundantes en animales) en función del valor del logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua.

Tabla 2: Afinidad de una sustancia por los tejidos grasos en función del valor del logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua

Valor log Kow	Afinidad por tejidos grasos
>de 5	Muy alta
3,5 a 5	Alta
3 a 3,5	Media
1 a 3	Baja
<de 1	Muy Baja

En general, los HAPs de baja masa molar son más volátiles, solubles en aguas y menos lipofílicos que los compuestos de alta masa molar. Estas características físicas y químicas determinan en gran medida su comportamiento en el ambiente y los procesos de descarga a otros receptores secundarios.

Por ejemplo, la transferencia a otros compartimentos del ambiente y la degradación es más alta para estos compuestos, los HAPs de baja masa molar, son más volátiles, por lo tanto dominan en el aire y se encontrarán principalmente en la fase vapor (Jaward y col, 2004).

En suelos la mayoría de los HAPs son fuertemente adsorbidos a la materia orgánica del suelo (Chiou y col, 1998), reduciendo su disponibilidad tanto para ser biodegradados, como para ser absorbidos por las plantas y lixiviados al acuífero. Si los HAPs son transferidos a sistemas acuáticos, son rápidamente transferidos a los sedimentos y las concentraciones en la columna de agua reflejan el producto de solubilidad de cada compuesto. En el caso de derrames de petróleos o sus derivados en suelos, el producto derramado comienza a desaparecer por evaporación, dispersión y degradación microbiana.

La adsorción de un compuesto orgánico a través de la materia orgánica del suelo se describe con la siguiente ecuación:

$$K_{oc} = K_d / f_{oc} \quad [1]$$

En dónde K_{oc} es el coeficiente de distribución del compuesto orgánico entre el carbono orgánico del suelo y el agua de poro, K_d es el coeficiente de distribución del compuesto orgánico entre el suelo y el agua y f_{oc} es la fracción de carbono orgánico en el suelo. El K_{oc} tiene una relación directa con la solubilidad en agua y el K_{ow} del compuesto.

1.4 Fuentes de Emisión

Dada la amplia distribución de los HAPs, presente en la mayoría de los procesos de combustión, se puede determinar que los HAPs son ubicuos, es decir se encuentran de forma generalizada en el medio ambiente. Por lo que en general se puede realizar una división según su fuente de emisión, siendo esto así, se pueden distinguir dos tipos de fuentes como responsables de la presencia de HAPs en el ambiente.

- **1.4.1 Fuentes naturales**

Para efectos del INEM (Inventario Nacional de Emisiones de México) las fuentes naturales se definen como biogénicas o geogénicas. Una fuente biogénica sería la formación del Perileno en sedimentos anaeróbicos (Wild & Jones, 1995), y por su parte, las mayores fuentes de emisión es la geogénicas, de origen geológico, por lo tanto serían las erupciones de los volcanes las que emiten las mayores concentraciones de HAPs a la biota, otra fuente importante de HAPs serían los incendios forestales debidos a causas naturales (OMS, 2003). Sin embargo, en zonas de poca actividad volcánica, el aporte de HAPs proveniente de fuentes naturales, no es muy importante en comparación a fuentes antropogénicas.

1.4.2 Fuentes antropogénicas

Este término hace referencia a todas las formas en las que se originan HAPs que sean dependientes de la actividad humana. La amplia utilización de procesos de combustión de materia orgánica durante el último siglo ha hecho que la producción de HAPs sea un fenómeno habitual en nuestra sociedad. Los combustibles fósiles son de uso frecuente y abundante, sobre todo en tres ámbitos:

- **1.4.2.1 Las calefacciones domésticas**

Una fuente primaria de HAPs es la combustión incompleta de madera, gas y otros combustibles orgánicos. La concentración de las emisiones depende del tipo de combustible. En zonas rurales donde la calefacción es principalmente con madera, las emisiones puntuales por calefacciones domésticas son mayores que en zonas urbanas, especialmente en invierno.

- **1.4.2.2 Vehículos de motor**

Emisión de gases de vehículos, incluyendo barcos y aviones. En áreas urbanas una de las fuentes principales de HAPs son los gases de los tubos de escape.

Esta cantidad de contaminante, varía en función del tipo de vehículo, época de fabricación y tipo de combustible utilizado. La aplicación de normas de control de contaminación que rigen para la fabricación de vehículos en esta última década, tales como la utilización de convertidores catalíticos, gasolinas sin plomo marcan un límite de contención a los niveles de contaminación atmosférica urbana. Lo que origina una gran diferencia en los niveles de emisión de los vehículos nuevos y antiguos, siendo estos últimos los que producen mayor contaminación (Domenech, 1996).

- **1.4.2.3 Usos industriales**

Los HAPs se forman también en muchos procesos industriales o se emiten al ambiente de trabajo por la utilización de productos ricos en HAPs en muchas industrias. Algunos HAPs se utilizan en medicina y para la producción de tintas, plásticos y pesticidas. Se encuentran HAPs en el petróleo crudo, el asfalto, el carbón, el alquitrán, la brea, la creosota y algunos disolventes comerciales. También se produce emisión de HAPs en plantas de generación de energía eléctrica, incineradoras de residuos domésticos y de origen agrícola, y la industria metalúrgica, especialmente del hierro y el aluminio.

- **1.4.2.4 El tabaco y los alimentos**

Una de las formas de combustión incompleta de origen antropogénico es la que conlleva el hábito de fumar. Entre los muchos productos que se originan en la combustión, el humo del tabaco contiene cantidades importantes de HAPs.

Los HAPs formados en la combustión del tabaco se encuentran tanto en el humo directamente inhalado por el fumador, como en el que se exhala después o el que se emite directamente. Algunos HAPs pueden formarse también como productos de la pirólisis de los carbohidratos, aminoácidos, y ácidos grasos. Así pues, muchos alimentos, especialmente carnes elaboradas a la parrilla, en que la cocción se produce a elevadas temperaturas y en contacto directo con la llama, se forman HAPs en la superficie del alimento. Lo mismo ocurre en los procesos de tostado a elevada temperatura de productos derivados de cereales, como el pan, la pizza y ahumado de pescado o carnes.

1.4.3 Fuentes de combustión

Las emisiones de HAPs como resultado de las actividades humanas también se pueden dividir en fuente de combustión estacionaria y fuentes de combustión móviles.

- **1.4.3.1 Combustión estacionaria**

Las principales fuentes fijas que emiten HAPs son instalaciones de generación de calor y energía (termo y carboeléctricas), calefacción con carbón y madera, quemadores de gas, incineración de residuos orgánicos municipales e industriales, quemas intencionales e incendios forestales y diversos procesos industriales (coque, cracking del petróleo, fundidoras, producción de asfalto, etc.).

- **1.4.3.2 Combustión móvil**

Cualquier máquina, aparato o dispositivo emisor de contaminantes a la atmósfera, al agua y al suelo que no tiene un lugar fijo, se le considera una fuente móvil, los mayores ejemplos son los vehículos como automóviles, barcos, aviones, los cuales queman grandes cantidades de combustibles fósiles, y en menor medida la combustión del humo del cigarrillo.

1.5 Formas y niveles de exposición a los HAPs

Las poblaciones humanas pueden estar sometidas a cuatro tipos de exposición a los HAPs: ambiental, dietética, del humo de tabaco, y ocupacional.

1.5.1. Exposición ambiental

Es más probable que en el medio ambiente la exposición se deba a los HAPs volátiles del aire, o a los HAPs que están adheridos al polvo y a otras partículas presentes en el aire. La vía de exposición es fundamentalmente inhalatoria.

Los HAPs son ubicuos en el medio ambiente, dando lugar a niveles basales detectables en la población general. En el aire de las áreas rurales se han encontrado niveles de algunos HAPs que oscilan entre 0,02 y 1,2 ng/m³. En áreas urbanas los niveles detectados varían de 0,15 a 20 ng/m³. Las concentraciones han disminuido sustancialmente durante los últimos 30 años.

1.5.2 Exposición por humo del tabaco

La exposición al humo del tabaco comporta el acceso al interior de los pulmones de una cantidad importante de HAPs, junto con otras sustancias tóxicas, mediante la inhalación directa del humo por parte del fumador. Para el fumador la inhalación de humo del tabaco es una forma de exposición directa y específica.

Se estima que un fumador de un paquete de cigarrillos ingiere entre 2 y 5 µg/día.

1.5.3 Exposición por la dieta

Una gran parte de los alimentos que consumimos de forma habitual contienen HAPs, aunque sea en cantidades mínimas. Los vegetales cultivados en suelos o atmósferas contaminadas pueden contener trazas de HAPs. También pueden encontrarse HAPs en alimentos a base de cereales y los lácteos. Cocinar carne y otros alimentos a altas temperaturas, lo cual ocurre cuando se utiliza carbón o leña, aumentando las cantidades de HAPs presentes en los alimentos. Lo mismo ocurre al ahumar los alimentos.

Para los alimentos que se consumen crudos la UE ha fijado un límite máximo de 0,3 µg/kg. Aun no se ha fijado un límite para alimentos ahumados, aunque en algunos países como Francia, Alemania, Suiza se han establecido valores de 1 µg/kg.

1.5.4 Exposición ocupacional

En algunas personas la principal fuente de exposición a los HAPs ocurre en el lugar de trabajo. La exposición ocupacional es principalmente por inhalación de gases y partículas, pero en algunos casos, exposición por la piel, al entrar en contacto o manipular sustancias con un elevado contenido en HAPs.

La exposición ocupacional en industrias con exposición a HAPs, el Benzo[a]pireno se encuentra a veces a concentraciones de 10 a 100 µg/m³, cuando en el aire la concentración típica es del orden de pocos ng/m³. Por otra parte es una exposición que puede tener variaciones en su concentración, y que tiene lugar durante un período limitado de tiempo a lo largo de la semana. Finalmente, con frecuencia la exposición ocurre en lugares confinados, sometidos a condiciones no habituales de temperatura, y en muchas ocasiones con exposición a otros compuestos químicos.

1.5.4 Niveles de referencia en la Exposición Ocupacional a HAPs.

Diversas instituciones internacionales han establecido límites de exposición ocupacional recomendado como concentración promedio ponderado de tiempo, éstas se pueden comparar en la Tabla 3.

Tabla 3: Comparación de instituciones y sus rangos permisibles de HAPs en exposición ocupacional.

Institución	Promedio ponderado (Hora)	Concentración
NIOSH (USA)	10	0,1 mg/m ³
ACGIH (USA)	8	0,2 mg/m ³
OSHA (USA)	8	0,2 mg/m ³
DFG (Alemania)	8	5 µg/m ³ 2 µg/m ³ (*)
INSHT (España)	8	2 µg/m ³

(*) Para el Benzo[a]pireno de 5 µg/m³ durante la producción y carga de los hornos de coquificación, y 2 µg/m³ en el resto de localizaciones.

1.6 Degradación de HAPs

Los HAPs más pesados (4 a 6 anillos) son más persistentes que los pequeños (Conte y col, 2000). Los mecanismos de destrucción de HAPs son principalmente químico y biológico, e incluyen biodegradación, oxidación abiótica, hidrólisis, destrucción UV en la superficie (Basel, 2002). La biodegradación de HAPs depende principalmente de su biodisponibilidad. Esta biodisponibilidad depende de la cercanía de los microorganismos a los sitios en donde se encuentran sorbidos los HAPs en el suelo. Algunos microorganismos producen biosurfactantes que favorecen la desorción de HAPs desde la materia orgánica del suelo, ya que los solubilizan, aumentando su biodisponibilidad, y por ende, pueden biodegradar a estos compuestos, siendo éste el paso fundamental para que se inicie el proceso de biodegradación (Voparil & Mayer, 2000).

La intensidad de la biodegradación depende de la temperatura (a 5°C es nula a 30°C es muy alta), de la presencia de agua y oxígeno (generalmente la biodegradación se lleva a cabo bajo condiciones aerobias; se conocen pocos informes de procesos de biodegradación bajo condiciones anaerobias), de los nutrientes, de los microorganismos presentes y de los procesos de adsorción que impiden que el compuesto sea soluble y por lo tanto biodisponible.

Se ha observado que las concentraciones de HAPs en el ambiente de regiones tropicales son más bajas que en las regiones polares debido a una rápida degradación microbiana, fotooxidación y volatilización (Wilcke y col, 1999).

1.7 Efectos sobre la salud

Curiosamente, los HAPs están presentes desde los orígenes de la medicina laboral; a ellos se debe que por primera vez se reconociese que el trabajo y las sustancias a las que se está expuesto pueden ser causa de enfermedad. En 1775 los médicos británicos Percival Pott y John Hill informaron de la aparición anormalmente elevada de un tipo de tumor genital, el cáncer de piel del escroto, entre los deshollinadores. Este tipo de tumor prácticamente no se encontraba en otros pacientes. Su deducción fue que algunos de estos trabajadores acababan por desarrollar este extraño tumor tras muchos años de exposición al hollín.

En 1918 los japoneses Katsuburo Yamgiwa y Koichi Ichikawa consiguieron inducir cáncer de piel en conejos producido por la aplicación de alquitrán.

Sin embargo tanto el alquitrán como el hollín son mezclas de diversas sustancias, y el aislamiento de los compuestos químicos responsables del posible efecto resultaba complejo. En 1920 por primera vez se indicaron a los hidrocarburos aromáticos policíclicos como los compuestos posiblemente cancerígenos del alquitrán.

El Departamento de Salud y Servicios Humanos (DHHS) de EE.UU. ha determinado que es razonable predecir que algunos HAPs son carcinogénicos para el ser humano, debido a las evidencias en animales y por estudios epidemiológicos que muestran el desarrollo de cáncer en ciertas personas que han respirado o estado en contacto con mezclas de HAP por largo tiempo. Es importante señalar la consideración que se tiene de que todos los HAPs en general, son sospechosos de ser carcinogénicos en un grado u otro, aunque el nivel sea muy bajo.

1.7.1 Absorción y metabolismo de los HAPs

La exposición humana a los HAPs se produce sobre todo por inhalación, ingestión u absorción. Tras su absorción por el organismo se distribuyen ampliamente en todos los tejidos, especialmente los con mayor contenido graso. Los HAPs no tienden a acumularse en el organismo, y la mayoría de ellos son eliminados principalmente por la orina y heces.

Pero un aspecto de interés para comprender la actividad biológica de los HAPs es su metabolismo, es decir, la serie de transformaciones que sufren una vez absorbidos por el organismo. Como con cualquier sustancia externa, el organismo trata de eliminarlos, proceso que se conoce como detoxificación, y que se realiza mediante enzimas. Este proceso tiene lugar sobre todo, aunque no exclusivamente, en el hígado.

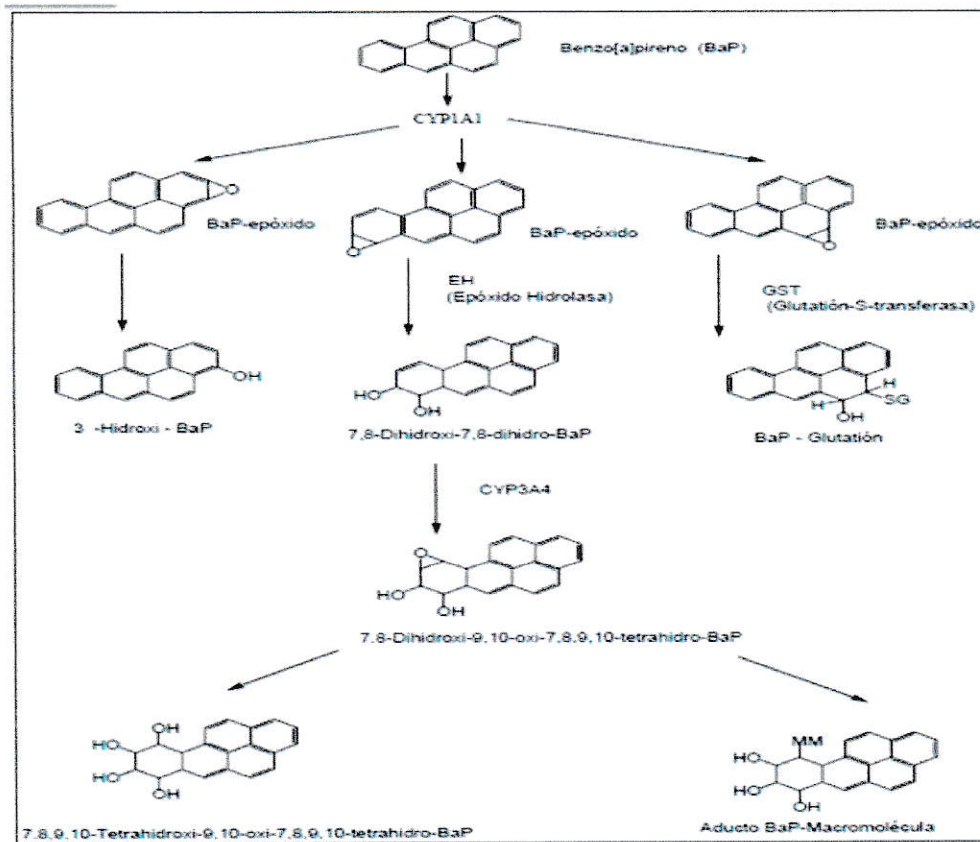


Figura 2: Ruta metab3lica del Benzo(a)pireno.

El primer paso consiste en la oxidaci3n de los HAPs; posteriormente, al compuesto oxidado se le a3ade una mol3cula abundante en el organismo como el glutati3n; este paso se conoce como conjugaci3n. El proceso de oxidaci3n-conjugaci3n tiene como objeto que un compuesto que originalmente era soluble en las grasas se haga hidrosoluble (soluble en el agua) y favorecer as3 su eliminaci3n por la orina.

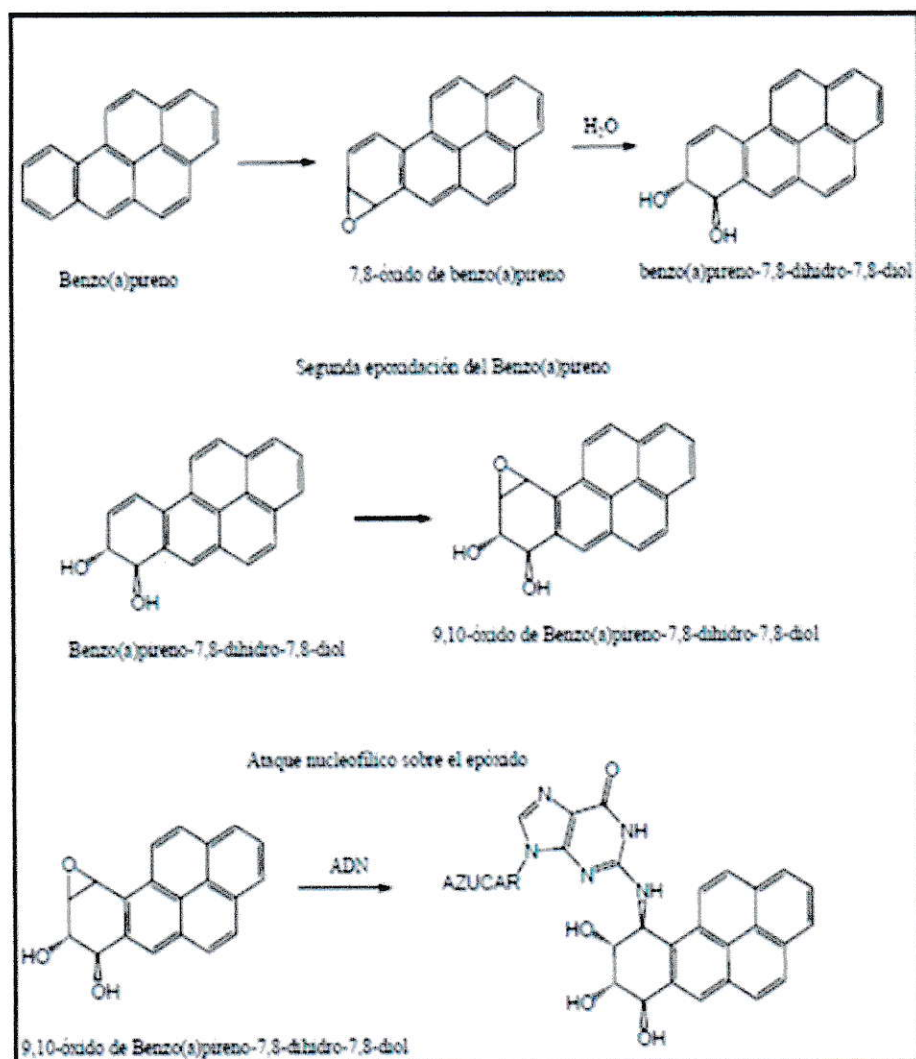


Figura 3: Proceso de solubilización de Benzo(a)pireno.

Por desgracia, el paso intermedio de la oxidación produce compuestos conocidos como epóxidos que son altamente reactivos, con capacidad para unirse a moléculas complejas, como las proteínas y el ADN. Esta última característica es la responsable de la capacidad genotóxica de los HAPs.

1.7.2 Los HAPs como causa de cáncer

La capacidad de producir cáncer es sin duda el principal motivo de preocupación por el cual es necesario estudiar, legislar e identificar HAPs. El principal mecanismo para la inducción de tumores por parte de los HAPs es su genotoxicidad. El efecto cancerígeno de los HAP ha sido claramente demostrado en los seres humanos para diversos tumores y para varios tipos de exposición.

El alto poder cancerígeno de estos compuestos, se debe a que poseen una región en su estructura con una elevada energía de deslocalización de electrones, que permiten interaccionar con los enlaces covalentes (Spivack y col, 2001).

Existe un grupo de enzimas que son capaces de convertir los compuestos xenobióticos lipofílicos (incluidos los HAPs) en productos solubles en agua. Este tipo de enzimas son las "Mixed Function Oxidases" (MFO). En este proceso de eliminación de los HAPs se forman compuestos intermedios llamados epóxidos. Son estos derivados de los HAP los que tienen la capacidad de adherirse al ADN formando lo que se conoce como aductos.

El ADN es fundamental para la vida ya que es la molécula que forma los genes. Cuando la célula se divide, cada una de las células resultantes contiene una copia del ADN original. En este proceso de copia del ADN, la presencia de sustancias extrañas adheridas (como los aductos de HAPs) pueden hacer que la copia sea defectuosa, es decir que se produzca un cambio en la nueva molécula de ADN; dicho cambio se conoce con el nombre de mutación. Si esta mutación se produce en algunos genes clave, que controlan el crecimiento celular, la célula puede entrar en un estado de crecimiento incontrolado, que a la larga puede ser el inicio de un cáncer.

1.7.3 Clasificación de la exposición a HAPs como cancerígenos

Diversos organismos y agencias han establecido clasificaciones para determinar la carcinogenicidad de sustancias químicas. Actualmente la más aceptada es la clasificación de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, conocida por sus siglas en inglés IARC, con sede en Lyon (Francia), dependiente de la Organización Mundial de la Salud (OMS). La clasificación la IARC tiene cuatro grupos principales:

Tabla 4: Clasificación de la IARC para sustancias cancerígenas.

Grupo	Definición
Grupo 1	Substancias o exposiciones que son cancerígenos para el ser humano.
Grupo 2A	Substancias o exposiciones que son " <i>probables</i> " cancerígenos para el ser humano. En general se clasifican en este grupo las sustancias que son claramente cancerígenas en experimentación animal pero para las que no hay suficiente información en los seres humanos.
Grupo 2B	Substancias que son " <i>posibles</i> " cancerígenos para el ser humano. En general se clasifican en este grupo sustancias para las que no hay suficiente información en los seres humanos, y no se puede concluir que sean claramente cancerígenos animales.
Grupo 3	Substancias para las que no se dispone de suficiente información sobre su capacidad carcinogénica.
Grupo 4	Substancias que probablemente no son carcinogénicas para los seres humanos.

Cuando una sustancia se clasifica en el grupo 1 significa que no hay duda sobre su potencial para producir cáncer. Deben promoverse acciones de protección de la salud y se deben establecer medidas regulatorias para prevenir la exposición a la misma. Las sustancias clasificadas en el grupo 2A deben ser objeto de atención, y el principio de precaución sugiere actuar prácticamente como si fueran del grupo 1. De hecho, las sustancias del grupo 2A son objeto prioritario de investigación que aporte nuevas pruebas.

1.7.4 Clasificación de la IARC para los HAPs.

Respecto a los *HAP individuales* la última actualización de la IARC ha establecido la siguiente clasificación:

Tabla 5: Clasificación de la IARC para los HAPs.

Grupo	HAPs
Grupo 1	Benzo[a]pireno.
Grupo 2A	Ciclopenta[c,d]pireno, Dibenzo[a,h]antraceno y Dibenzo[a]pireno.
Grupo 2B	Benzo[j]aceantrileno, Benzo[a]antraceno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[j]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[c]fenantreno, Criseno, Dibenzo[a,h]pireno, Dibenzo[a,i]pireno, Indeno[1,2,3-cd]pireno.

1.8 Normativa

A fin de proteger la salud pública es preciso fijar contenidos máximos permitidos de los diversos HAPs, aunque se le ha puesto especial normativa al Benzo(a)pireno, ya que es el componente más estudiado, la normativa se le ha aplicado a determinadas matrices como:

- Alimentos con procesos de ahumado.
- Alimentos expuestos a contaminación medioambiental, como derrames de hidrocarburos.
- Contaminantes ambientales como el Material Particulado.
- Aguas de consumo.
- Aguas continentales superficiales

Para los HAPs tiene por objeto aplicar el principio de que la exposición a esos contaminantes tiene que ser lo más baja posible. No establece valores límite para las emisiones de HAPs, pero utiliza el Benzo(a)pireno como indicador del riesgo cancerígeno de esos contaminantes y fija para éste un valor objetivo que deberá alcanzarse. Las Guías Internacionales de la OMS de 1971 señalaron que algunos HAPs son cancerígenos y que las concentraciones de seis HAP representativos (Fluoranteno, 3,4-benzofluoranteno, 11,12-Benzofluoranteno, 3,4-Benzopireno, 1,12-Benzopireno e Indeno[1,2,3-cd]pireno) no deben superar, en general, los 0,2 µg/L.

En la primera edición de las Guías para la calidad del agua potable de 1993 concluyeron que no se disponía de datos suficientes para calcular valores de referencia para los HAPs en el agua de consumo, salvo para el Benzo[a]pireno.

Se calculó un valor de referencia para el Benzo[a]pireno, correspondiente a un valor máximo del riesgo adicional vitalicio de cáncer, de 0,7 µg/L. Este valor de

referencia se mantuvo en el apéndice a la segunda edición de las Guías, publicado en 1998, ya que se confirmó en nuevos estudios sobre su capacidad cancerígena.

En la Tabla 6 observamos los límites de calidad de aguas de consumo y naturales indicados por organismos internacionales frente a HAPs y el B[a]pyr.

Tabla 6: Límites de Calidad de aguas de consumo y naturales de organismos internacionales frente a HAPs totales y Benzo[a]pireno.

Referencia	Matriz	Año	Límite máx HAPs totales (µg/L)	Valor guía de B[a]Pyr (µg/L)
OMS	Aguas Subterráneas	2003	0,005 – 10	0,7
OMS	Agua Potable	2003	0,001 – 11	0,7
U Europea	Agua Potable	1998	0,1	0,01
US EPA	Agua Potable	2006	0,2	0,02
IDEM	Agua Subterránea (uso residencial)	2001	0,15	0,2
IDEM	Agua Subterránea (uso industrial)	2001	2,5	0,2

En el caso particular de la Normativa Chilena, no se encuentran legislados los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en aguas de consumo. Las normativas sobre aguas en Chile, como la NCh 1333 de 1978, Norma chilena sobre requisitos de calidad del agua para diferentes usos, y la NCh 409, Norma chilena sobre Agua Potable, no establecen ningún máximo de concentración para HAPs en ninguna matriz, especialmente en el agua.

La Norma Chilena Oficial NCh 409/1.Of2005 Agua Potable – Parte 1 – Requisitos, que se considerada en sus definiciones por Norma Chilena Oficial NCh 1333.Of78, Modificada en 1987 Requisitos de calidad del agua para diferentes usos, señala explícitamente que entre los parámetros que definen los requisitos de calidad del agua se tienen los de Tipo II “Elementos o sustancias químicas de importancia para la salud”, sin hacer mayor mención o definición de los mismos.

A su vez, el D.S. 76/2009, Modifica Decreto N° 735, de 1969, “Reglamento de los Servicios de Agua Destinados al Consumo Humano” establece claramente en su Artículo 9° que las aguas que se utilicen para agua potable “...no deberán contener sustancias tóxica...”, sin embargo no hace ninguna referencia ni define estas sustancias.

En este contexto podemos señalar que si bien la normativa chilena no es explícita en mencionar los HAPs como una sustancia a controlar en las aguas a utilizar para consumo humano, sí está abierta la posibilidad de incorporar éstas en el caso que se demuestre científicamente que representan un riesgo para la salud de la población.

En el artículo 11° de la Ley 19.300, en su inciso último, se enuncia que tanto para evaluar el riesgo como para evaluar los daños adversos a la salud se considerará lo establecido en las normas de calidad ambiental y de emisión vigentes, en el caso de que exista una carencia de tales normas, se utilizarán como referencia las vigentes en los Estados que señale el reglamento. Para esto el Reglamento del SEIA estipula en su 7° artículo que las normas de calidad ambiental y de emisión que se utilizarán como referencia, serán aquellas vigentes en los siguientes Estados: República Federal de Alemania, República Argentina, Australia, República Federativa del Brasil, Confederación de Canadá, Reino de España, Estados Unidos Mexicanos, Estados

Unidos de Norteamérica, Nueva Zelanda, Reino de los Países Bajos, República de Italia, Japón, Reino de Suecia y Confederación Suiza.

El D.S N° 143/08 del Ministerio Secretaría General de la Presidencia de la República, “Establece Normas de Calidad Primaria para las aguas continentales superficiales apta para actividades de recreación con contacto directo”, donde se establece un valor máximo permitido para el “Benzo(a)pireno”, este valor máximo es de 0,0022 mg/L ósea 2,2 µg/L, con una frecuencia de monitoreo mínima anual de 1 vez cada 3 meses y mínimo 1 vez en época de baño. El método establecido es el 6440 B Método Cromatográfico Extracción Líquido Líquido – Cromatografía de gases – Detector de masa.. Con condiciones de muestreo descritas en la NCh 411/3 Of96. Calidad de agua-Muestreo-Parte3: Guía sobre la preservación y manejo de muestras. D.S N° 501/96, del Ministerio de Obras Públicas, o en “Collection and Preservation of Samples” descritas en el número 1060 Del “Standard Methods for Examination of Water and Wastewater”. 20th Edition 1998. APHA-AWWA-WPCF o ediciones posteriores. Este Decreto Supremo tiene por objeto proteger la calidad de las aguas continentales superficiales para salvaguardar la salud de las personas.

Si bien en Chile no está normado el contenido de HAPs en aguas para consumo humano, sí existe la regulación del Benzo(a)pireno, el HAPs más peligroso, en aguas continentales superficiales aptas para actividades recreativas. El análisis para estimar su concentración en aguas, es realizado por laboratorios certificados y lo realizan principalmente grandes empresas que se adhieren a normativas y estándares de calidad internacionales, cumpliendo principalmente los valores expuestos en las Guías de la OMS o EPA.

1.8.1 Concentraciones de HAPs en algunas ciudades

En algunas ciudades de Estados Unidos, se encontraron en 1997 concentraciones en el agua potable desde 0.0047 mg/L hasta 12,44 mg/L lo cual los obligó a tomar medidas de control fuertes.

En los ríos Uruguay y Río de la Plata se detectaron concentraciones de HAP de entre 1,8 y 12 µg/L, en aguas costeras de la Patagonia, afectadas por actividades de extracción de petróleo, el rango fue de 8-41 µg/L.

En las aguas costeras de Chile, específicamente en Quintero (Bonert & Dorián, 1989) se determinaron una concentración de 0,1 a 2,34 Ng/L, lo cual se estima como que no se indicó alguna señal de contaminación.

En Santiago de Chile, se han realizado mayores estudios en el área de contaminación atmosférica por HAPs, principalmente se reportaron concentraciones promedio de HAPs para el período de invierno del año 1992, de 34 ng/m³, esta concentración promedio se mantuvo por varios años, observándose una disminución en la concentración de HAPs y B[a]Pyr en el año 1995. Durante el año 1995 y 1996 se reportó una concentración promedio para el período de invierno de 9,2 ng/m³ y 4,9 ng/m³ respectivamente [Adonis & Gil, 2000]. Esta disminución en las concentraciones de HAPs cancerígenos y no cancerígenos coincide con la aplicación del primer Plan de Descontaminación de la Región Metropolitana [Adonis, 1999].

2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La Cromatografía líquida de alta resolución o *High performance liquid chromatography* (HPLC), es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que avanzan por la columna.

El tiempo que tarda un compuesto en ser eluido, se denomina tiempo de retención (t_r) y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. Los disolventes que componen la fase móvil más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo.

Una mejora introducida a la técnica de HPLC es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como elución en gradiente. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto. El gradiente separa los componentes de la muestra como función de la afinidad del compuesto por la fase móvil. Al utilizar un gradiente agua/acetonitrilo, se espera que los compuestos hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos, como nuestro analito de interés, HAPs, se espera que eluyan a concentraciones elevadas de acetonitrilo, para esto se trabajará con una gradiente que aumente la concentración de acetonitrilo en el tiempo.

2.1 Sistema de Detección

Los sistemas de detección habitualmente empleados son ultravioleta-visible, fluorescencia y espectrometría de masas o masas-masas. La detección mediante espectroscopía ultravioleta-visible se ha utilizado principalmente para la determinación de HAPs seleccionando la longitud de onda de 254 nm para registrar los cromatogramas.

En el caso de muestras de tan bajas concentraciones, como los HAPs es bastante difícil identificarlos en muestras de aguas naturales y potables. En caso de laboratorios, donde deben identificar y determinar concentración en un porcentaje muy alto de seguridad, es necesario contar con una segunda confirmación del resultado, para ello se puede utilizar un detector de Fluorescencia en línea con el UV-Visible, para registrar ambos cromatogramas para una misma muestra, y tener una mayor certeza de la presencia de estos analitos en las muestras, o si se cuenta con detectores de masas, el extracto podrá ser evaluado en forma cualitativa y cuantitativa simultáneamente.

3. Metodología de Extracción

El fin de cualquier metodología de preparación de muestra es disponer del analito en el estado más “puro” posible y en un disolvente compatible con la técnica de determinación utilizada, HPLC.

Para ello, en la mayoría de los métodos analíticos es necesario realizar una primera etapa en la cual se aislará los analitos de la matriz “agua” que los contiene consiguiendo su purificación y concentración.

Las matrices acuosas suelen contener los compuestos a concentraciones muy inferiores a los límites de detección de los equipos utilizados en la etapa de determinación. Además, es muy probable que la matriz no sea compatible con la técnica de medida, por lo cual suele ser necesaria una etapa de preparación de muestra que, sobre todo en matrices medioambientales, nos permita concentrar los analitos y a su vez separarlos de otros compuestos que puedan interferir en su determinación.

En este trabajo se ha considerado una metodología alternativa de extracción, la extracción en fase sólida, como una alternativa a la ya utilizada extracción líquido-líquido en muestras de aguas para el análisis de HAPs.

3.1 Extracción en Fase Sólida (SPE)

La SPE es una técnica de concentración de muestras, que permite obtener extractos libres de interferencia, proporcionando bajos límites de detección. La SPE comenzó a desarrollarse mediante la aparición de técnicas de preconcentración por extracción sólido-líquido con materiales adsorbentes. La utilización de esta técnica permite aislar, purificar y preconcentrar compuestos químicos de manera rápida y reproducible.

Desde su primera aplicación en los años 50, la expansión de la SPE ha sido constante, llegando a ser hoy en día una de las más utilizadas, debido a la síntesis de nuevos adsorbentes que han incrementado la selectividad de la extracción. Mediante la SPE, conseguimos concentrar y/o purificar los analitos mediante su retención en una fase sólida, o una fase líquida inmovilizada sobre un soporte sólido, para a continuación proceder a su elución con un disolvente adecuado (Thurman & Mills, 1998).

Entre las múltiples ventajas que presenta destacan las siguientes:

- Rapidez y simplicidad en la preparación.
- Proporcionar extractos limpios, libres de interferencias.
- Permita alcanzar un nivel de concentración adecuado para el análisis de trazas.
- Consume una cantidad considerablemente menor de disolventes orgánicos.
- Generar el menor costo posible en el proceso.
- Permita procesar un gran volumen de muestras.
- Permita la posibilidad de automatización del proceso.

3.1.1 Adsorbente de Extracción en Fase Sólida

El adsorbente de extracción en SPE está contenido en tres posibles formatos: discos, cartuchos y jeringas. El primero se utiliza principalmente para concentrar grandes volúmenes de muestra, hasta 2 y 4 L (Loraine & Pettigrove, 2006), permitiendo flujos de paso de líquido muy elevados debido a la escasa resistencia al paso de muestra que poseen. En los discos el sorbente está inmovilizado en una membrana de microfibra.

El mayor inconveniente reside en que un componente de la matriz, tal como los sólidos en suspensión saturan el sistema impidiendo su filtración, lo que dificulta la interacción entre el analito y el sorbente, por lo general esto se resuelve filtrando previamente un volumen de muestra la que posteriormente es sometida al sistema de concentración por SPE. Los dispositivos de cartuchos y jeringas pueden ser fácilmente integrados en sistemas on-line con el equipo de medida, generalmente un cromatógrafo de líquidos. De este modo, la manipulación de la muestra es mínima, aunque los volúmenes concentrados son inferiores a los empleados en las aplicaciones off-line.

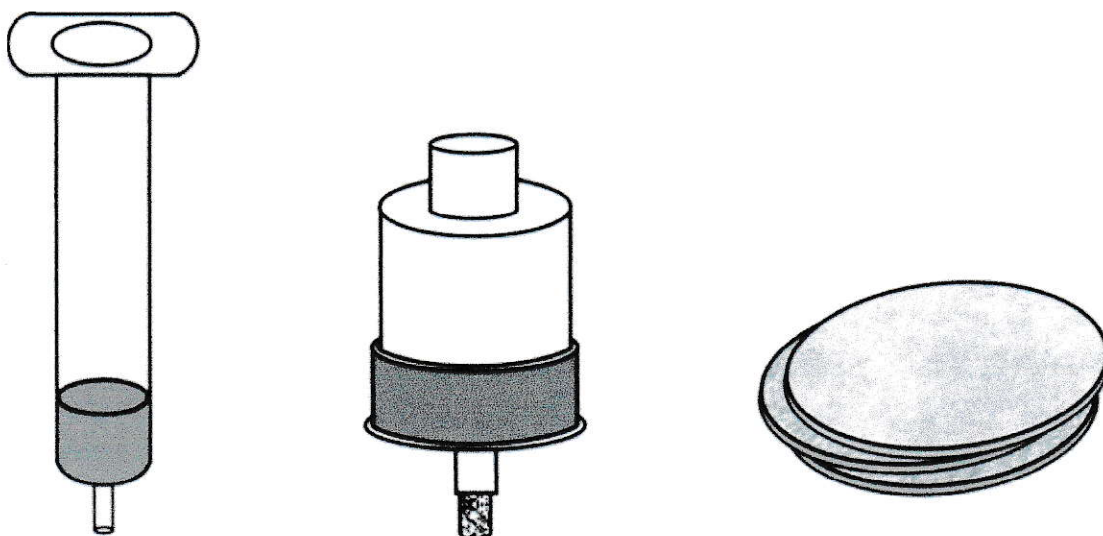


Figura 4. Distintos formatos de SPE: Jeringa, Cartucho y Discos.

La SPE en cualquiera de sus formatos requiere una serie de pasos para su funcionamiento, los 4 pasos esenciales son los siguientes:

1. Acondicionamiento de la fase estacionaria.- Se hace pasar a través del cartucho un disolvente o mezcla de disolventes adecuados, eliminando así las impurezas, hidratando la fase estacionaria y facilitando la transferencia de materia con la muestra.
2. Paso de la muestra a través del material adsorbente.- El objetivo de esta etapa es retener cuantitativamente el analito, consiguiendo además un cierto grado de selectividad.
3. Lavado.- Se utilizan disolventes con gran afinidad por las interferencias.
4. Elución.- Con un disolvente apropiado se recupera el analito de la fase adsorbente.

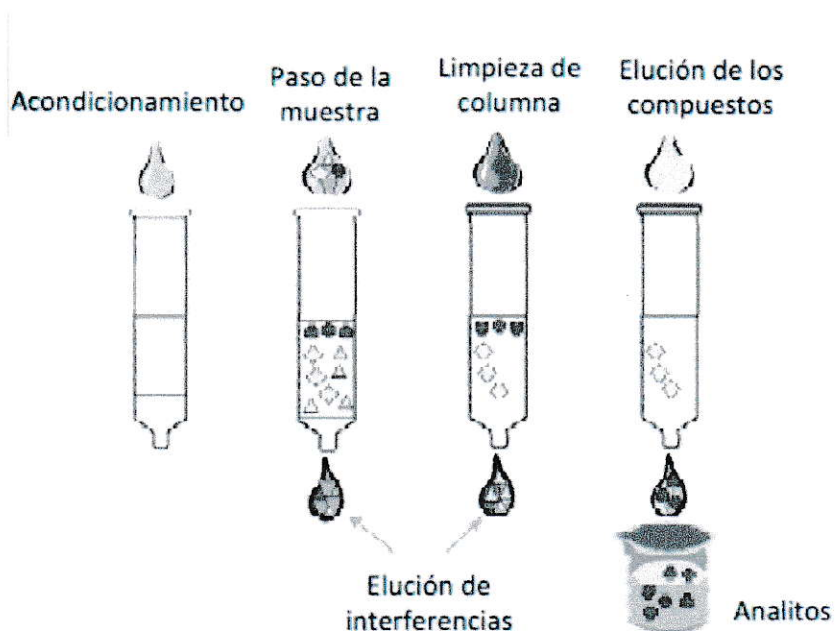


Figura 5. Esquema de preparación de muestra mediante SPE.

Las fases adsorbentes en SPE son similares a las empleadas en cromatografía de líquidos. Las más comunes son las de sílices enlazadas, polímeros de tipo estireno-divinilbenceno, carbón grafitizado, silicato de magnesio, sílica gel y óxidos de aluminio.

Tabla 7: Adsorbentes más comunes en SPE.

Adsorbente	Tipo de fase	Estructura
Octadecilsilano (C18)	Invertida	-Si-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃
Octilsilano (C8)	Invertida	-Si-(CH ₂) ₇ -CH ₃
Sílice	Normal	-Si-OH
SCX	Cambiador iónico	-Si-(CH ₂) ₃ -SO ₃
Oasis HLB	Polimérica	Divinilbenceno-vinilpirrolidona

El interés de las técnicas de extracción basadas en un material sorbente reside en la disponibilidad de una amplia gama de fases, que dan una gran selectividad. Los sorbentes se emplean actualmente para extraer compuestos orgánicos de varias matrices incluyendo agua, aire y algunos suelos. Un sorbente con una gran afinidad hacia compuestos orgánicos retendrá estos compuestos y los concentrará desde muestras muy diluidas.

Dependiendo de las características del sorbente, la retención de los analitos se produce por adsorción, absorción, interacción antígeno-anticuerpo o por un mecanismo de retención mixto. La desorción de los analitos (elución) puede tener lugar mediante el empleo de un pequeño volumen de disolvente apropiado.

Considerando la naturaleza semivolátil de los hidrocarburos, el método clásico propuesto, es el EPA 3510, extracción líquido-líquido, técnica universalmente conocida, la cual últimamente ha sido muy cuestionada, por su gran impacto al medioambiente debido a la utilización de grandes volúmenes de solventes de alta pureza que deben ser evaporados para concentrar los analitos de interés, que finalmente terminan en el medio externo, además de requerir de una preparativa laboriosa, suelen ocurrir problemas asociados a las interferencias coextraídas desde la muestra, lo que dificulta su análisis, requiriendo etapas posteriores de limpieza, "clean up".

La elección de la técnica adecuada para realizar la preconcentración de la muestra, está dada principalmente por la naturaleza de la matriz y el tipo de compuesto a analizar (volátil, semivolátil), según lo cual se pueden distinguir los siguientes tipos de extracción.

Tabla 8: Métodos para extracción de compuestos orgánicos semivolátiles y no volátiles.

Método EPA	Matriz	Tipo de extracción	Analitos
3510	Agua	Extracción líquido-líquido	Semivolátiles y no volátiles orgánicos
3535	Agua	Extracción en fase sólida (SPE)	Semivolátiles y no volátiles orgánicos
3540	Sólido	Extracción por Soxhlet	Semivolátiles y no volátiles orgánicos
3545	Sólido	Extracción del fluido a presión (ASE)	Semivolátiles y no volátiles orgánicos
3560/3561	Sólido	Extracción de Fluidos supercríticos	Hidrocarburos semivolátiles y HAP

3.2 Extracción Líquido-Líquido, método EPA 3510

La extracción líquido-líquido es una técnica de preparación de muestra en la cual se produce una transferencia de los analitos desde una fase, generalmente acuosa, a otra orgánica, transferencia regida por una constante de reparto. El mayor problema derivado de esta técnica es el gran consumo de disolventes, con el correspondiente gasto y problema medioambiental.

La ELL ha sido utilizada para extraer HAPs en muestras de aguas potables y aguas naturales. En estos trabajos la extracción ha sido llevada a cabo con hexano o diclorometano, con un volumen de 150 mL de solvente por muestra. El extracto obtenido es concentrado a un volumen conocido y llevado a análisis por HPLC, según lo indicado en el método EPA 8310.

HIPÓTESIS

- Es posible realizar la cuantificación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en muestras de agua potable y naturales, a través del método EPA 3535, Extracción en Fase Sólida, con su posterior análisis por HPLC.

Objetivo General

- Validar metodología analítica 3535 (EPA) de acuerdo a requerimientos normativos dados por el manual de método de la SISS, para la determinación analítica de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, por HPLC mediante la técnica de extracción en fase sólida, para muestras de aguas.

Objetivos Específicos

- Estandarizar las condiciones de concentración y elución del SPE para el análisis de HAPs.
- Manejar la estación de extracción en fase sólida (SPE) y la preparación de muestras para su análisis en el HPLC.
- Desarrollar una técnica alternativa a la extracción líquido-líquido que permita preconcentrar y extraer compuestos orgánicos.
- Elaborar patrones internos para la realización de la recta de calibrado, la cual servirá para comparar y discriminar resultados.
- Comparar los actuales límites establecidos en el laboratorio por extracción líquido-líquido y los alcanzados con esta nueva técnica.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1 Materiales

1.1 Equipos

- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC)
- Columna Inertsil ODS-3 3 μm 4,6 x 250 mm
- Calefactor Columna Waters Millipore
- Bomba Binaria Perkin Elmer Serie 200
- Detector UV-Visible Waters 486
- Detector de Fluorescencia Waters 474
- Autosampler Waters 717 plus
- Desgasificador en línea Waters UF
- Estación de Concentración Supelco visidry para SPE

1.2 Instrumentación

- Discos de extracción en fase sólida para análisis, 3M™ Empore™ de fase C-18. de 47 mm de diámetro y 12 μm de diámetro de partícula.
- Equipo de extracción al vacío, Empore (Figura 8).
- Corriente de Nitrógeno.
- Línea de vacío.
- Microjeringas de vidrio (10, 50 y 100 μL) Hamilton.
- Viales de vidrio ámbar (15 mL) tapa rosca y contratapa de teflón.
- Material de vidrio de uso general y volumétrico clase A.

1.3 Reactivos

- Agua grado reactivo, clase 1 Millipore para análisis de trazas.
- Diclorometano, Fischer Scientific para Cromatografía.
- Acetonitrilo, J. T. Baker, para Cromatografía.
- Metanol, Lichrosolv Merck para Cromatografía.
- MetilTerButilEter J.T. Baker para Cromatografía.
- Patrón certificado de mezcla de 16 HAPs de concentración 100 µg/mL en metanol, Chem Service.

1.4 Softwares

- Software para la adquisición y procesamiento de datos CSW32.
- Microsoft Office Excel 2007.

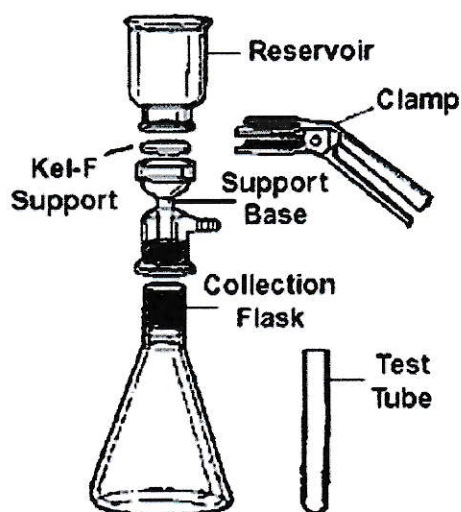


Figura 6: Equipo de extracción al vacío, Empore.

2. Procedimiento

2.1 Soluciones de trabajo (curva de calibración)

Se realizó una curva de calibración de 6 diluciones del estándar de HAPs

Para la curva se midieron distintos volúmenes con las jeringas Hamilton de 1,0 2,5 5,0 25,0 50,0 y 100,0 μL , del estándar de 100 $\mu\text{g/mL}$, a estos volúmenes de estándar se agregó a un volumen final de 500 mL con agua grado reactivo para análisis de trazas. Se realizó además blanco de reactivos, con 500 mL de agua grado reactivo para análisis de trazas.

Tabla 9: Volúmenes y concentraciones utilizadas para realizar la curva de calibración.

Nivel	Volumen (μL) de estándar (*)	Concentración ($\mu\text{g/L}$)
1	1,0	0,2
2	2,5	0,5
3	5,0	1,0
4	25,0	5,0
5	50,0	10,0
6	100,0	20,0

2.2 Protocolo de preparación de la muestra

La metodología de extracción y concentración de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), mediante el empleo de disco de Extracción Empore 3M es considerada para el análisis de agua potable y sus fuentes de captación superficiales y subterráneas, debido a la naturaleza heterogénea de las muestras, se debe considerar como punto de partida la cantidad de sólidos en suspensión. Las muestras con turbiedades mayores a 1 UNT (Unidad Nefelométrica de Turbiedad) deben ser filtradas a través de un filtro de vidrio de 0,45 mm de poro, antes de ser sometidas al proceso de extracción y concentración.

El empleo de la metodología de extracción y concentración del disco 3M involucra 4 pasos críticos.

1. Lavado del disco.

Con el propósito de eliminar alguna posible contaminación, se requiere un paso de limpieza del disco, que consiste en hacer pasar 10 mL de diclorometano grado HPLC, para lograr la limpieza, llevando el sistema a sequedad.

2. Acondicionamiento

El proceso de acondicionamiento se realiza con 10 mL de metanol, donde se deja pasar aproximadamente 1 mL dejando el remanente de solvente durante 15 segundos, luego se deja pasar los demás mililitros gota a gota, sin dejar que se seque, con el fin de solvatar las moléculas del adsorbente, posteriormente se sigue el acondicionamiento con un lavado de 10 mL de agua Grado Reactivo Millipore, nuevamente sin dejar que se seque el disco.

Si en alguna etapa se seca el disco es necesario volver al paso de acondicionamiento partiendo con metanol.

3. Carga de la muestra

La carga de muestra se debe realizar sobre el disco previamente acondicionado, la metodología establecida fue con un volumen de 500 mL de muestra con un flujo de aproximadamente 30 mL/min.

Una vez pasada la totalidad de la muestra, se debe secar el disco, a través de vacío, para eliminar la mayor cantidad de agua.

4. Elución de la muestra

La elución de los analitos de interés se realiza en el tubo colector dentro del kitasato, con 20 mL de diclorometano, en dos porciones de 10 mL cada una, para lograr la adsorción de los analitos en el solvente orgánico, llevando a sequedad en ambos casos el disco.

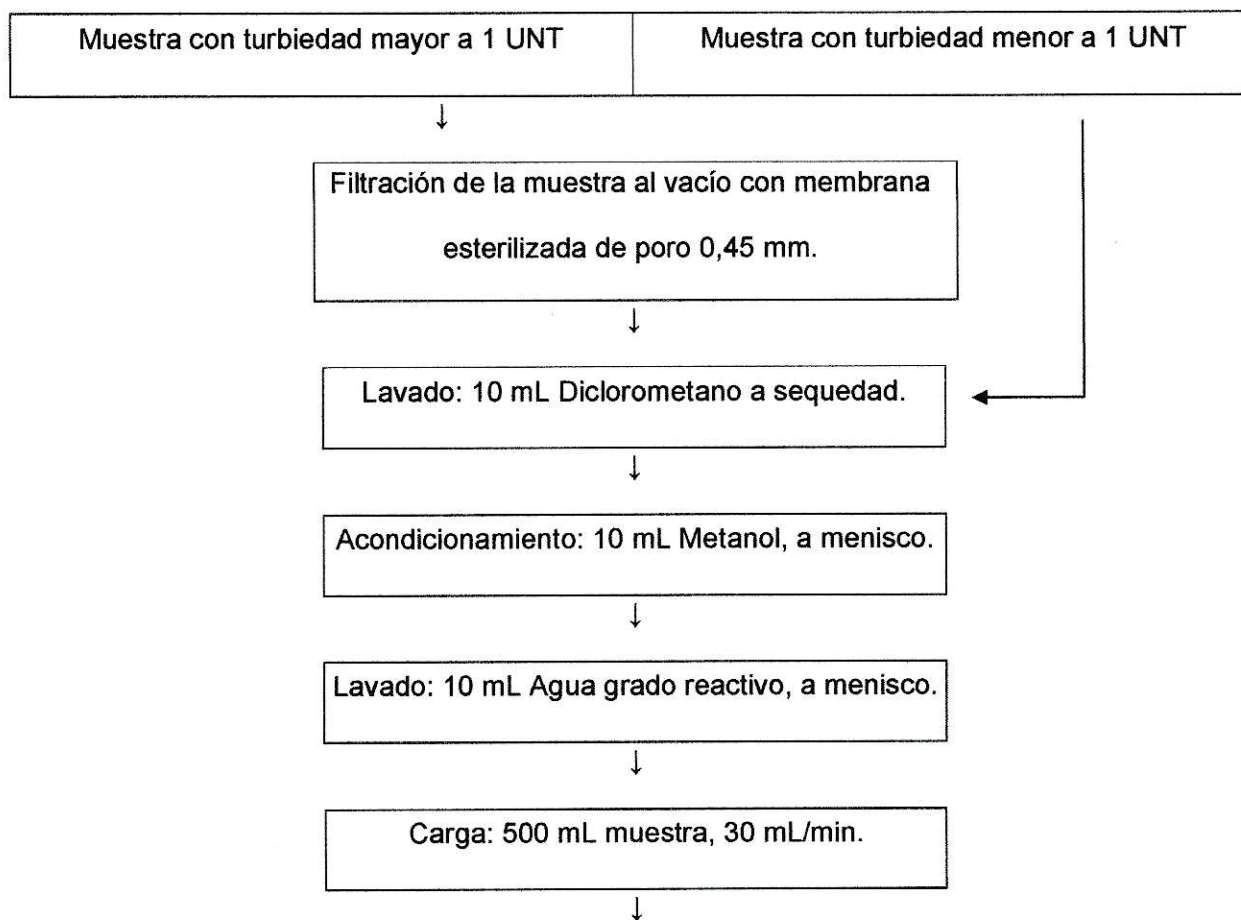
Luego de estos 4 pasos críticos para la extracción, se requiere que los 20 mL de diclorometano recolectado en el tubo, sean deshidratados, para lograr estos se requieren pasos posteriores a la extracción antes de su inyección en el equipo HPLC.

La deshidratación comienza con el empleo de sulfato de sodio anhidro, para ello el eluato es traspasado a un balón de concentración con un embudo conteniendo lana de vidrio y sulfato de sodio anhidro, este matraz esférico se lleva a concentración en un evaporador rotatorio a vacío, con baño termostatzado a 50° C.

Luego de la concentración en rotavapor del extracto, se realiza un cambio de solvente agregándole acetoniitrilo.

El volumen final de extracto se debe llevar a 1 mL de acetonitrilo mediante el empleo de un sistema de corriente de nitrógeno. El extracto resultante es traspasado a los viales de vidrio color ámbar, para cromatografía de 1,8 mL con septa de silicona del automuestreador para su posterior análisis en HPLC.

En la Figura 6, se observa un diagrama de flujo de toda la preparación de la muestra, desde la filtración de 500 mL de muestra de agua potable o natural hasta lograr un extracto de 1mL que contiene los analitos de interés (HAPs) en acetonitrilo para su posterior análisis en HPLC.



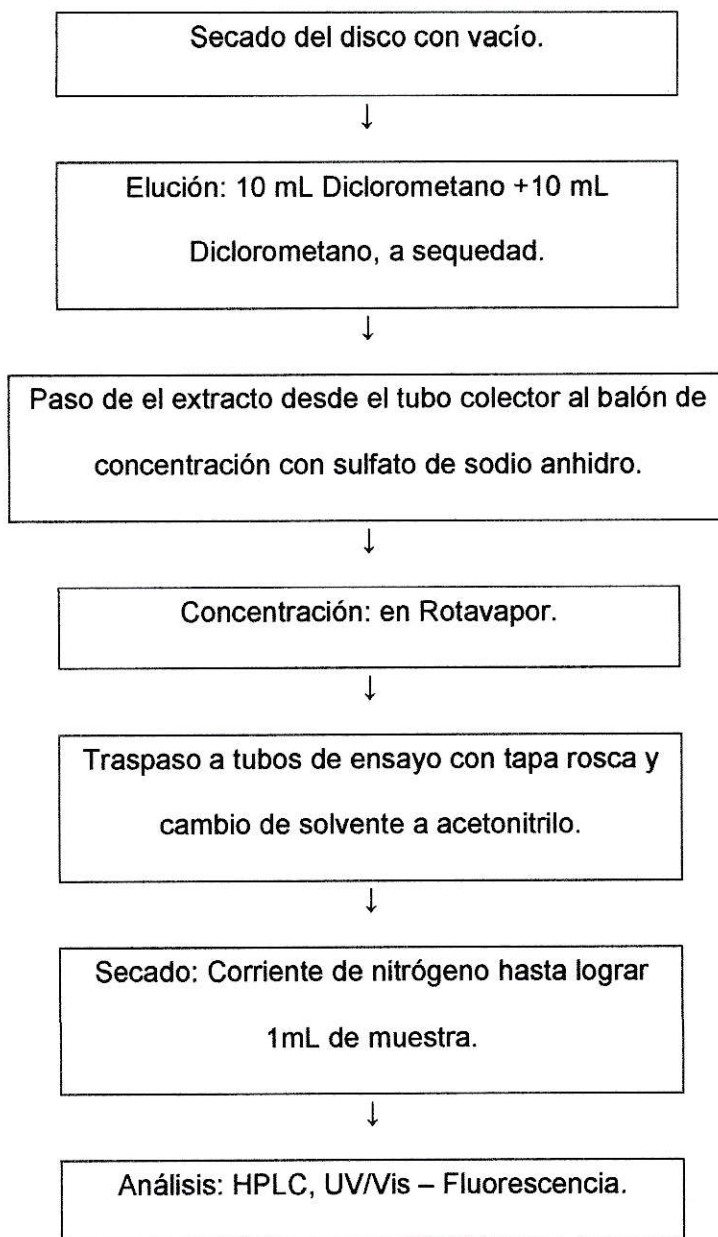


Figura 7: Diagrama de flujo, procedimiento SPE

2.3 Parámetros operacionales del HPLC

El método de HPLC usado para la separación y detección de los hidrocarburos aromáticos policíclicos consistió en una detección dual por UV-Visible y Fluorescencia. El detector UV-Visible se empleó en una longitud de onda de 254 nm y la sensibilidad de 0,020 AUFS, el detector de Fluorescencia fue establecido a una energía de Excitación (EX λ) de 280 nm y una energía de Emisión (EM λ) de 389 nm, Ganancia (GAIN) de 10 y Atenuación (ATTEN) de 16. Se empleó un sistema de inyección automático (autosampler) el análisis se realizó empleando una Columna Inertsil ODS-3 3 μ m 4,6 x 250 mm. La fase móvil empleada fue acetonitrilo y agua, utilizando una gradiente binaria, como lo demuestra la Figura 7. La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 1,0 mL/min con un volumen de inyección de 50 μ L de extracto.

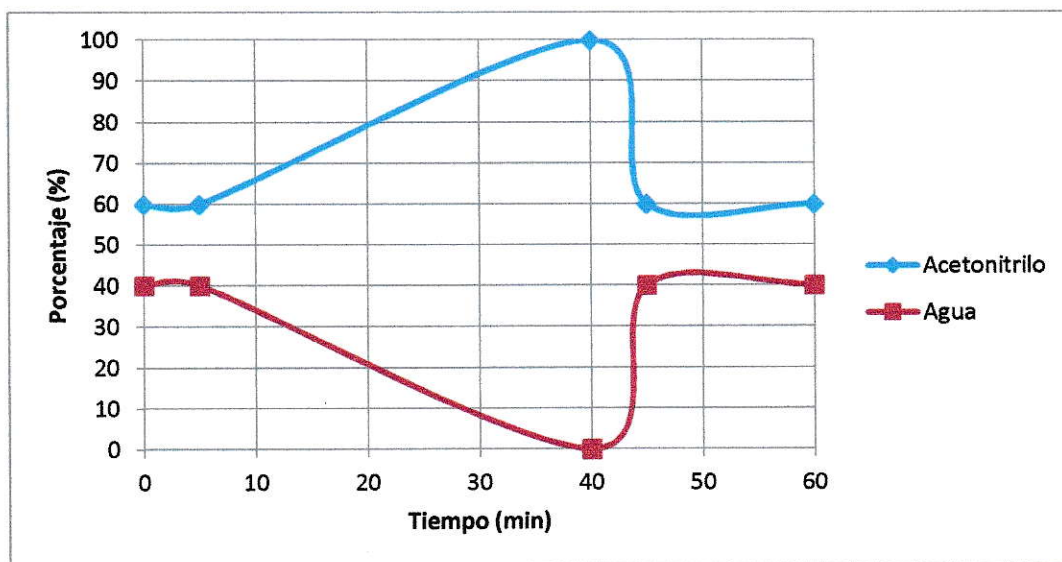


Figura 8: Gráfico de Gradiente de Fase móvil.

2.3.1 Resumen de condiciones instrumentales.

Detector UV-Visible

- Longitud de onda: 254 nm
- Sensibilidad: 0,020 AUFS

Detector Fluorescencia

- Energía de Excitación: 280 nm
- Energía de Emisión: 389 nm
- Ganancia (GAIN): 10
- Atenuación (ATTEN): 16

Columna Intersil ODS-3 3 μ m 4,6 x 250 mm.

- Temperatura de calefactor: 40°C
- Velocidad de flujo: 1 mL/min
- Volumen de inyección: 50 μ L

Gradiente Binaria

- A: acetonitrilo
- B: agua

Tabla 10: Resumen de Gradiente Binario de la fase móvil.

Paso	Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% A	% B
0	0	1,0	60	40
1	5	1,0	60	40
2	35	1,0	100	0
3	5	1,0	60	40
4	15	1,0	60	40

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Método Cromatográfico

En las Figuras 9 y 10, se muestran los cromatogramas del estándar de HAPs, para una concentración de $1 \mu\text{gL}^{-1}$, se puede identificar cada espectro de los compuestos y sus tiempos de retención.

En la Figura 9, se observa con claridad los 16 HAPs analizados por UV-Visible, peak finos y con un tiempo de retención claro, a excepción de los 3 primeros compuestos, Naftileno, Antraceno y Acenaftileno, esto se debe principalmente a su elevada presión de vapor, lo cual los hace volátiles, al manipular estos compuestos para su extracción, parte de ellos se evaporan, no lográndose una buena resolución de los mismos.

Por esta razón que se deben extremar las medidas de precaución durante la concentración de los extractos en el rotavapor y corriente de nitrógeno con el fin de evitar concentrar a sequedad para disminuir las pérdidas asociadas a los compuestos más volátiles.

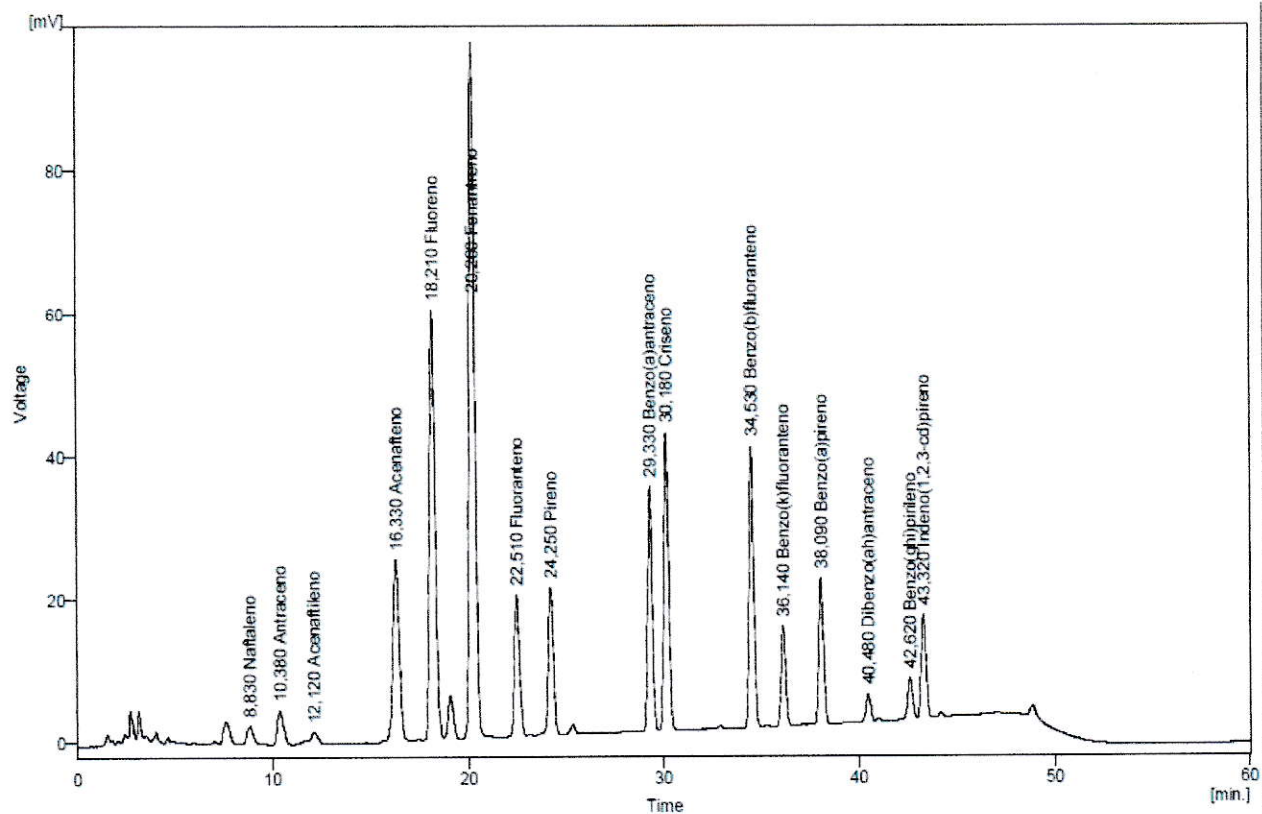


Figura 9: Cromatograma del estándar de HAPs, con detector UV-Visible.

La Figura 10, nos muestra el cromatograma del estándar obtenido con el detector de fluorescencia, aquí sólo se observan 14 compuestos, tanto el Acenafileno como el Benzo(ghi)pirileno, no son identificados en el detector de Fluorescencia, esto se debe a es muy mala la resolución de estos compuestos en fluorescencia, para poder observarlos se hubiese necesitado trabajar a niveles de concentración más altos, perdiendo la sensibilidad de los otros compuestos.

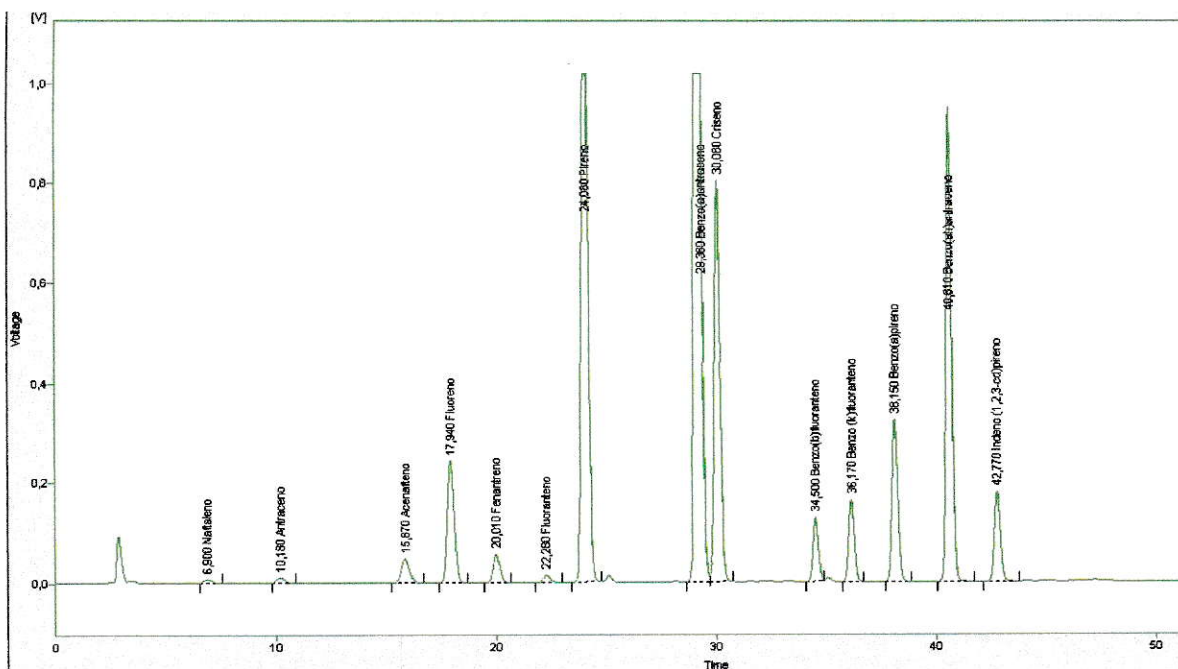


Figura 10: Cromatograma del estándar de HAPs, con detector de Fluorescencia.

La determinación de la concentración de las muestras de aguas reales, se obtuvo a través de la curva de calibración realizada con el estándar de HAPs, el valor cuantitativo se logró por la curva de calibrado obtenido con el detector UV-Visible. El detector de fluorescencia sólo se utilizó como confirmatoria para determinar la presencia del compuesto en las muestras naturales. Al ser el detector de Fluorescencia 100 veces más sensible que el detector UV-Visible es más fácil de determinar la presencia de HAPs en aguas, pero esta misma sensibilidad, produce que ciertos compuestos se saturan rápidamente en la columna obteniéndose una mala resolución en el cromatograma y no se pueda obtener una concentración real de la muestra, por lo que la detección dual UV-visible y Fluorescencia, nos confirma con mayor certeza tanto la presencia del compuesto como su concentración.

Tabla 11: Tiempos de retención obtenidos para los dos detectores utilizados.

Nombre HAP	Tiempo de retención (min) en Detector UV-Visible	Tiempo de retención (min) en Detector Fluorescencia
Naftaleno	8,8	7,1
Antraceno	10,3	10,5
Acenaftileno	12,1	-
Acenafteno	16,3	16,3
Fluoreno	18,2	18,4
Fenantreno	20,3	20,4
Fluoranteno	22,5	22,7
Pireno	24,3	24,6
Benzo(a)antraceno	29,3	29,5
Criseno	30,2	30,4
Benzo(b)Fluoranteno	34,5	33,1
Benzo(k)Fluoranteno	36,1	34,7
Benzo(a)pireno	38,1	38,21
Dibenzo(a,h)antraceno	40,5	40,7
Benzo(ghi)pirileno	42,6	-
Indeno(1,2,3-cd)Pireno	43,3	42,7
(-): No Detectado		

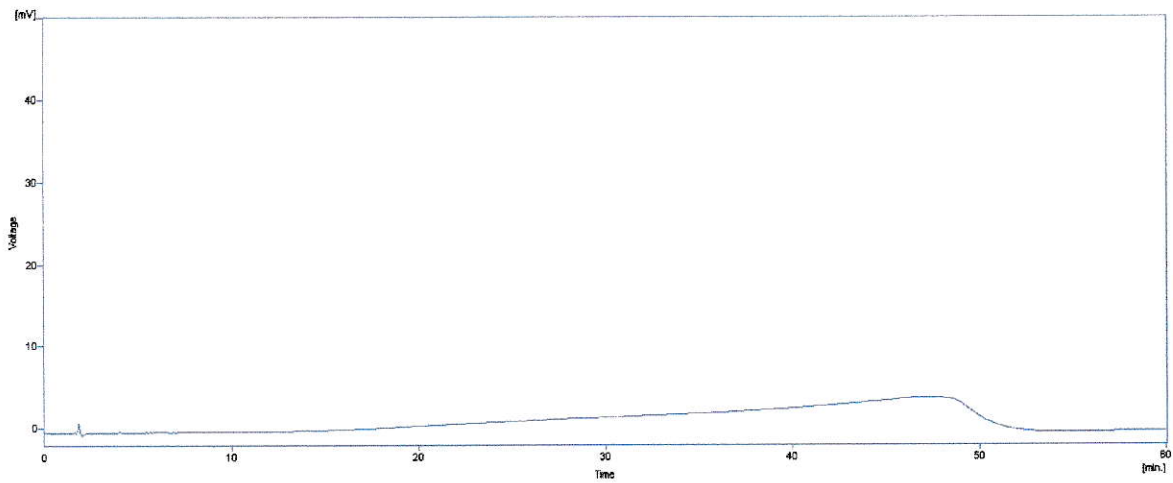


Figura 11: Cromatograma de una muestra real analizada con detector UV-visible.

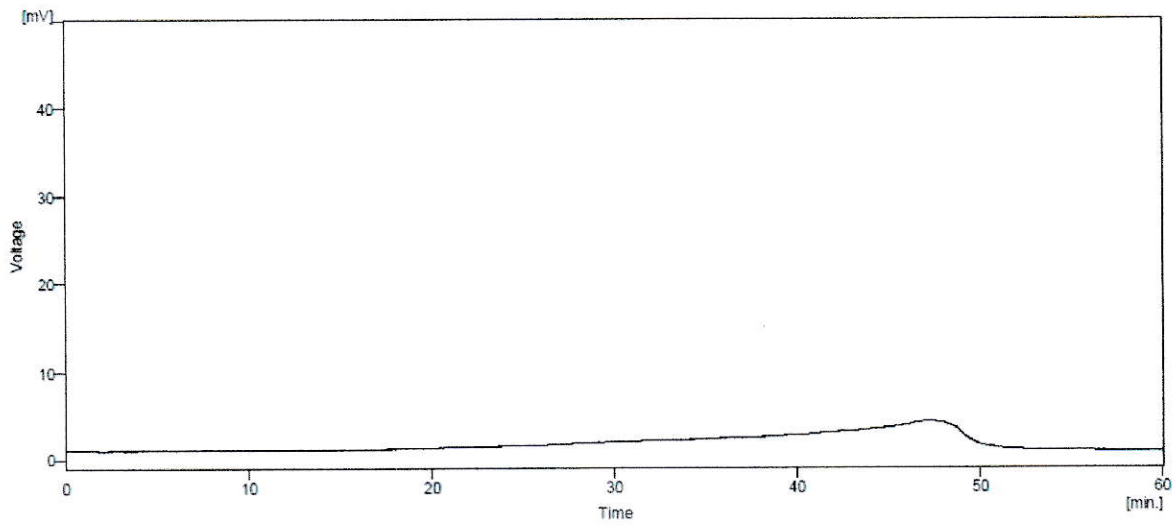


Figura 12: Cromatograma de una muestra real analizada con detector de Fluorescencia

Las Figuras 11 y 12, son los cromatogramas de una muestra real de agua potable de la ciudad de Santiago, sometida a extracción en fase sólida y posterior análisis por HPLC con detector UV-Visible y de Fluorescencia en línea. La muestra siguió el protocolo de la Norma EPA 8310 "Polynuclear Aromatic Hydrocarbons", en su sección de "Almacenamiento, transporte y recolección de muestras", donde se recomienda un frasco ámbar de 1 L, para evitar degradación, sin preservantes, transporte y almacenamiento en refrigeración ($T^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$) y debe ser analizada dentro de los 40 días de extracción.

Se puede observar que la muestra no presenta picos en los tiempos de retención (tr) característicos de los HAPs en ningún cromatograma, por lo tanto se determina que no existe superposición de picos.

Uno de los beneficios de trabajar con dos detectores en línea, es confirmar o desechar de manera rápida la existencia de algún pico característico de HAPs observando los 2 cromatogramas. También se puede utilizar el extracto obtenido en la extracción en fase sólida en otros equipos instrumentales, como lo es Cromatografía Gaseosa con sus diversos detectores.

2. Curvas de calibración obtenidas:

Para el análisis cuantitativo de los HAPs se realizó la calibración del equipo. La curva realizada, está comprendida entre los rangos de 0,2 a 20 μgL^{-1} , estos valores se seleccionaron porque eran los que mejor se correlacionaban de acuerdo a la sensibilidad establecida en los detectores. La recomendación de la OMS establece un máximo permitido de 0,7 μgL^{-1} . Por lo que logrando una identificación de 0,2 μgL^{-1} se podrían identificar muestras de aguas en un nivel más bajos que el máximo permitido por las instituciones internacionales.

Tabla 13: Concentraciones obtenidas de la curva de calibración.

Nivel	Volumen (μL) de estándar (*)	Concentración (μgL^{-1})
1	1,0	0,2
2	2,5	0,5
3	5,0	1,0
4	25,0	5,0
5	50,0	10,0
6	100,0	20,0

(*) En 500 mL de agua grado reactivo clase 1

La curva de calibración de los 6 niveles se muestra en la Figura 11, las otras 15 curvas de calibración se muestran en el Anexo 1.

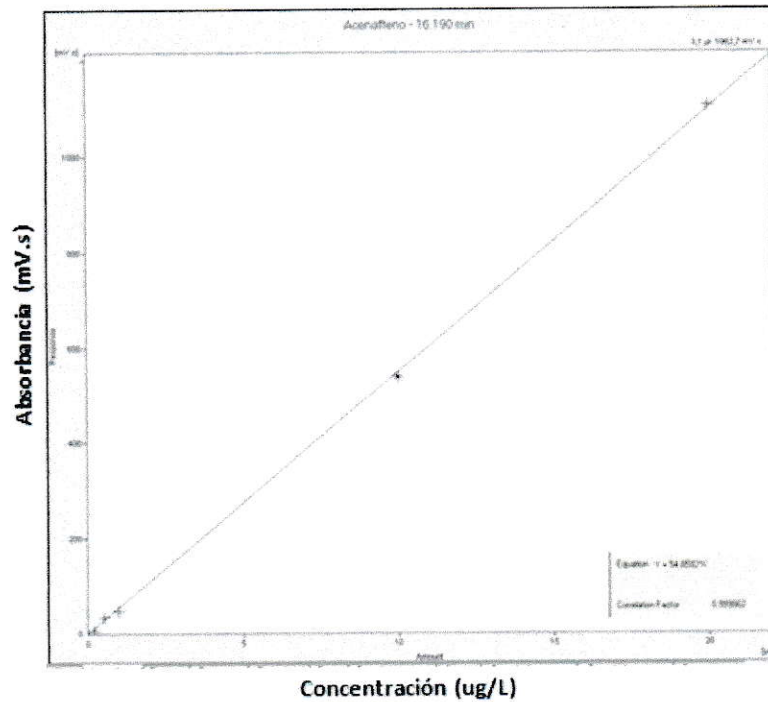


Figura 12: Curva de Calibración del Acenafteño para sus 6 niveles de concentración.

En la Figura 12 se observa un factor de correlación, R^2 de 0,99986, para el Acenafteño indicando una buena linealidad, los ejes que se observan son la respuesta del equipo frente a el valor de la concentración dados en los 6 niveles de la curva (Absorbancia / Concentración ug/L), bastante cercana a 1, ésta buena linealidad se observa en los 15 compuestos restantes en el Anexo 1.

3. Análisis Estadístico

La Superintendencia de Servicios Sanitarios, en su manual de métodos de ensayo para agua potable, 2007, establece los requerimientos de calidad analítica, para verificar el desempeño de métodos de ensayo en análisis físico-químico de parámetros de calidad de agua (Anexo 3). Según la SISS se requiere un manejo estadístico que incluya cálculo del límite de detección, límite de cuantificación, precisión y exactitud.

Para el estándar de $1 \mu\text{gL}^{-1}$ analizado en ambos detectores, se calcularon los datos estadísticos necesarios para la confiabilidad del método, los cuales se muestran en la Tabla 13 y 14, para detector UV-Visible y Fluorescencia respectivamente. Calculándose para cada caso los siguientes parámetros.

̄X: Promedio

DE: Desviación estándar

RzC: Razón de Conformidad

LD: Límite de Detección

LC: Límite de Cuantificación

%DER: Desviación Estándar Relativa

3.1 Cálculo de Límite de detección del método

El límite de detección del método se obtiene experimentalmente, mediante el análisis por el mismo procedimiento del método de ensayo, de 10 repeticiones de blancos fortificados con el analito de interés (estándar de HAPs). Para llevar a cabo la fortificación, se utilizó la solución estándar de $1 \mu\text{gL}^{-1}$ para cada analito.

El límite de detección del método, es calculado a partir de la fórmula:

$$LD = t \times DE$$

Donde:

t= Estadígrafo t de Student para (n-1) grados de libertad, 99% de confianza y 1 cola (Anexo 2).

DE= Desviación estándar de las mediciones de blancos fortificados.

3.2 Cálculo de Límite de cuantificación del método

El límite de cuantificación del método se obtuvo experimentalmente, mediante el análisis por el mismo procedimiento de 10 repeticiones de blancos fortificados con el analito de interés (HAPs). El nivel de fortificación fue de $1 \mu\text{gL}^{-1}$.

El límite de cuantificación del método, es calculado a partir de la fórmula:

$$LC = 10 \times DE$$

Donde:

S= desviación estándar de las mediciones de blancos fortificados.

3.3 Razón de Conformidad

Adicionalmente para comprobar si el valor obtenido para Limite de Cuantificación es realmente aplicable para el método que se está verificando, se deberá cumplir el requerimiento de razón de conformidad:

$$4 < R < 10$$

Donde R es la razón entre la media de las réplicas y el LC calculado. Si R cae fuera del rango deberá repetirse la determinación experimental considerando, si fuese necesario, otro nivel de fortificación.

3.4 Cálculo de Precisión del método

La precisión del método será controlada en términos de % de desviación estándar relativa, como precisión de repetibilidad o de reproducibilidad. Se realizaron 12 ensayos con muestras reales de agua potable que fueron fortificadas con el analito de interés (HAPs) en una concentración cercana al límite permitido, se utilizó $1 \mu\text{gL}^{-1}$. El % de desviación estándar relativa, es calculado a partir de la fórmula:

$$\% \text{ DER} = \frac{\text{DE}}{\text{C}_M} \times 100$$

Donde:

DE = Desviación estándar de la serie de mediciones de la muestra.

CM = Concentración media en la muestra (media de la serie de mediciones).

3.5 Cálculo de Exactitud del método

La exactitud de los métodos se controló en términos de % de recuperación de material de referencia MR de concentración conocida, preparado por el propio laboratorio a partir de un patrón provisto por proveedor reconocido. Se realizaron 12 mediciones, con un material de referencia en una concentración de 1 µgL⁻¹.

El % de recuperación será calculado a partir de la fórmula:

$$\% R = \frac{C_{exp MR}}{Ct MR} \times 100$$

Donde:

C_{exp MR} = Concentración experimental del MR.

C_{t MR} = Concentración teórica del MR.

Tabla 13: Tratamiento estadístico del método, para análisis por detector UV-Visible.

HAP	\bar{X} ($\mu\text{g/L}$)	DE	DER (%)	RzC
N	0,96	0,02	2,18	4,5
Ant	0,96	0,03	2,65	5,1
Acy	1,00	0,01	1,07	5,2
Ace	1,00	0,02	2,04	5,9
F	1,00	0,01	1,04	5,3
P	1,02	0,02	1,77	5,5
Fl	0,99	0,02	1,55	4,7
Pyr	0,99	0,02	1,99	5,1
B(a)Ant	1,02	0,02	1,48	4,4
Chr	1,02	0,01	0,92	5,7
B(b)Fl	1,01	0,01	1,28	4,2
B(k)Fl	1,02	0,01	1,11	4,4
B(a)pyr	0,99	0,01	1,12	4,6
DiB(ah)Ant	0,98	0,01	1,36	4,2
B(ghi)Per	0,98	0,02	1,94	7,0
lpyr	1,06	0,02	1,45	4,4

\bar{X} : Promedio
 DE: Desviación estándar
 RzC: Razón de Conformidad
 %DER: Desviación Estándar Relativa

Tabla 14: Tratamiento estadístico del método, para análisis por detector de Fluorescencia.

HAPs	\bar{X} ($\mu\text{g/L}$)	DE	%DER	RzC
N	1,04	0,05	2,18	7,3
Ant	1,01	0,06	2,65	6,9
Ace	1,07	0,05	1,07	8,0
F	0,99	0,08	2,04	4,6
P	1,13	0,04	1,04	9,9
Fl	0,97	0,05	1,77	7,1
Pyr	0,98	0,06	1,55	5,7
B(a)Ant	1,08	0,08	1,99	4,8
Chr	1,09	0,06	1,48	6,6
B(b)Fl	1,06	0,08	0,92	4,9
B(k)Fl	1,04	0,07	1,27	5,3
B(a)pyr	1,04	0,08	1,11	5,0
B(ghi)Per	0,95	0,06	1,12	6,0
lpyr	1,04	0,10	1,358	4,1

X: Promedio
DE: Desviación estándar
RzC: Razón de Conformidad
%DER: Desviación Estándar Relativa

En la Tabla 14, se observa el análisis estadístico para el detector de fluorescencia, los promedios estuvieron bastante cercanos al real, a excepción de Fluoreno y Pireno, estos dos compuestos presentaban saturación y se observó una mala resolución de la cromatografía, por lo que fue difícil obtener buenos valores para el análisis estadístico. La precisión del método es expresada en término de desviación estándar relativa (%DER), en promedio se obtuvo 1,6%, al no sobrepasa el 10%, al igual que el detector por UV-visible se dice que el método es reproducible (Miller, 2002).

La Exactitud del método, se obtiene a través del porcentaje de recuperación, para esto se contaminó 500 mL de agua grado reactivo con un patrón Chem Service de 100 µg/mL de HAPs, se realizó la extracción en fase sólida con el disco C18, el cual fue activada con un solvente polar como el metanol y luego eluido con 20 mL de diclorometano. Se utilizaron concentraciones de HAPs de 1 µgL⁻¹ para el análisis de recuperación en ambos detectores, obteniéndose porcentajes entre 95 y 102% para el caso del detector UV-Visible de 95 y 113%, las cuales se observan a continuación en la Tabla 15.

Tabla 15: Exactitud del método, a través del porcentaje de recuperación (%R) de todos los HAPs para una concentración de $1 \mu\text{gL}^{-1}$ en ambos detectores.

HAP	Exactitud UV-Vis	Exactitud Fluorescencia
N	95,4	104,0
Ant	96,0	101,3
Acy	100,7	-
Ace	100,7	107,0
F	100,9	99,5
P	102,0	112,7
Fl	99,5	97,0
Pyr	99,1	98,3
B(a)Ant	101,9	107,6
Chr	102,1	108,8
B(b)Fl	100,7	105,9
B(k)Fl	101,9	104,1
B(a)pyr	99,8	104,0
DiB(ah)Ant	97,9	95,2
B(ghi)Per	97,8	-
Ipyr	101,9	104,2
(-) No Detectado		

Tabla 16: Tratamiento estadístico del método, resultados para Límites de Detección y Límite de Cuantificación para detector UV-Visible y Fluorescencia.

HAPs	Detector UV-Visible		Detector Fluorescencia	
	LD (µg/L)	LC (µg/L)	LD (µg/L)	LC (µg/L)
N	0,05	0,21	0,14	0,54
Ant	0,06	0,25	0,15	0,56
Acy	0,03	0,11	-	-
Ace	0,03	0,11	0,13	0,51
F	0,05	0,21	0,22	0,82
P	0,02	0,10	0,11	0,43
Fl	0,05	0,18	0,14	0,52
Pyr	0,02	0,15	0,17	0,65
B(a)Ant	0,04	0,20	0,22	0,85
Chr	0,05	0,15	0,16	0,62
B(b)Fl	0,04	0,09	0,22	0,83
B(k)Fl	0,02	0,13	0,20	0,75
DiB(ah)Ant	0,03	0,13	0,16	0,60
B(a)pyr	0,03	0,11	0,20	0,80
B(ghi)Per	0,03	0,11	-	-
lpyr	0,04	0,93	0,25	0,96

LD: Límite de Detección
LC: Límite de Cuantificación

En la Tabla 16 se observa el resultado del análisis estadístico para determinar tanto el Límite de Detección como el Límite de Cuantificación en ambos detectores utilizados para una misma muestra.

En el detector de fluorescencia el LC menor es de $0,43 \mu\text{gL}^{-1}$ y el mayor $0,96 \mu\text{gL}^{-1}$, en cambio $0,09 \mu\text{gL}^{-1}$ y el mayor $0,93 \mu\text{gL}^{-1}$ en el detector UV-Visible. Se demuestra que el detector UV-Visible da valores más bajos de cuantificación, por lo que con este detector se obtienen los valores de concentración en el laboratorio, el Fluorescencia solo se utiliza como confirmatorio de la presencia del compuesto. Estos valores de LD y LC del detector UV-Visible son adecuados, ya que permiten detectar la presencia de HAPs a niveles trazas, y es de conocimiento general que los HAPs se encuentran en este rango de concentraciones sobre todo en las aguas naturales (Filipkowska, 2005).

El LD menor en UV-Visible es de $0,02 \mu\text{gL}^{-1}$ y en Fluorescencia es de $0,14 \mu\text{gL}^{-1}$ estos valores son aceptables.

Los resultados obtenidos para el LD y el LC de las curvas de calibración de ambos detectores garantizan la detección de los HAPs a niveles más bajos que los permitidos por la única Normativa Chilena que establece alguna concentración máxima permitida de Benzo(a)pireno en agua, la "Normas de Calidad Primaria para las aguas continentales superficiales apta para actividades de recreación con contacto directo" que es de $2,2 \mu\text{gL}^{-1}$.

4. Comparación de dos métodos de extracción.

En la Tabla 17 se da a conocer los valores obtenidos luego del análisis estadístico de los límites de detección y de cuantificación realizados en éste Seminario a través de la técnica de extracción en fase sólida (SPE). Como ya se había comentado con anterioridad el Laboratorio ANAM S.A, realizaba sus análisis de HAPs con la técnica de Extracción Líquido-Líquido, por lo tanto ellos cuentan con un análisis estadístico reciente, donde dan a conocer sus límites de cuantificación y detección. Por lo tanto en la Tabla 17, se comparan con los resultados obtenidos por parte del laboratorio ANAM S.A, realizando el mismo análisis estadístico, pero con la técnica de extracción líquido-líquido y los resultados obtenidos en éste Seminario. Ambos resultados son con los datos obtenidos por detector UV-Visible.

Tabla 17: Comparación de Limite de detección y cuantificación de técnica Extracción líquido-líquido y técnica extracción en fase sólida.

HAP	LD (µg/L)	LD (µg/L)	LC (µg/L)	LC(µg/L)
	Método SPE	Método ELL*	Método SPE	Método ELL*
N	0,050	0,044	0,210	0,440
Ant	0,060	0,043	0,254	0,430
Acy	0,025	0,043	0,108	0,430
Ace	0,049	0,041	0,206	0,410
F	0,025	0,041	0,105	0,410
P	0,049	0,042	0,180	0,420
Fl	0,025	0,045	0,154	0,450
Pyr	0,043	0,045	0,197	0,450
B(a)Ant	0,047	0,042	0,150	0,420
Chr	0,036	0,043	0,094	0,430
B(b)Fl	0,022	0,044	0,128	0,440
B(k)Fl	0,030	0,044	0,113	0,440
B(a)pyr	0,027	0,045	0,112	0,450
DiB(ah)Ant	0,031	0,047	0,133	0,470
B(ghi)Per	0,045	0,047	0,190	0,470
Ipyr	0,035	0,039	0,148	0,390
*ELL: Extracción líquido-líquido, datos entregado por ANAM S.A. SPE: Extracción en fase sólida.				

En la Figura 14, se observa el límite de cuantificación alcanzado por ambos métodos donde se puede observar que en la mayoría de los HAPs se logra una mayor sensibilidad de cuantificación con la técnica extracción en fase sólida, en los primeros compuestos, la brecha es menor, ya que por causa de la alta presión de vapor que presentan estos compuestos, la cual los hace volatilizarse con rapidez, perdiendo concentración al momento de la manipulación para lograr la extracción, pero de todas formas la concentración alcanzada para lograr su cuantificación es la óptima para compuestos trazas como los HAPs.

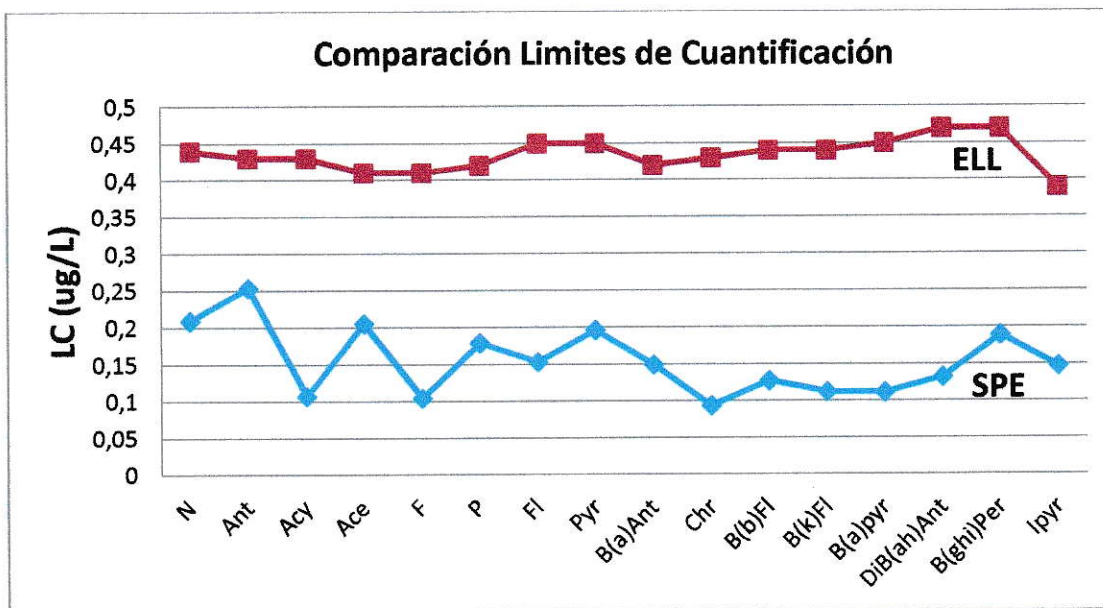


Figura 14: Gráfico de comparación para límite de cuantificación en técnica extracción en fase sólida y extracción líquido-líquido.

De esta forma se demuestra que la extracción en fase sólida logra un excelente Límite de Detección y Cuantificación, igual o mejor que la extracción líquido-líquido, al igual que para los otros parámetros estadísticos como Exactitud y Precisión. Pero además de esta ventaja, se logra otra muy importante como lo es la disminución del uso de grandes cantidades de solventes en cada muestra analizada, la cual es muy importante para el ámbito de los laboratorios de análisis, ya que al disminuir el uso de solventes, disminuyen costos operacionales y decrecen sus emisiones de contaminantes al ambiente.

IV. CONCLUSIONES

- Se desarrolló y validó una metodología de determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, por HPLC mediante la técnica de extracción en fase sólida, para muestras de aguas, según el método EPA 3535.
- Se estandarizaron las condiciones de concentración y elución del SPE para el análisis de HAPs.
- Se elaboraron patrones internos para la realización de la recta de calibrado, la cual se utilizó para comparar y determinar resultados.
- Se desarrolló una técnica alternativa a Extracción Líquido Líquido que permite preconcentrar y extraer compuestos orgánicos con su misma efectividad, e incluso mejor.
- Se redujeron los volúmenes de solventes orgánicos desde 150 mL por muestra a sólo 30 mL. Por lo tanto se disminuyó la emisión de disolvente a la atmósfera en más de un 70%, si se piensa que en un laboratorio analítico se pueden llegar a procesar más de 30 muestras diarias, el volumen disminuido se hace mucho más considerable.
- El método propuesto resulta ser más ecológico, sensible, preciso y económico, ya que los laboratorios que antes contaban con análisis de HAPs con la técnica de extracción líquido-líquido, pueden modificar sus operaciones y ahora trabajar con extracción en fase sólida, ya que no es necesario realizar una inversión importante en instrumentación cara y sofisticada para cambiar de ELL a SPE, además de disminuir los volúmenes de solventes utilizados.

- Al comparar los límites de detección y cuantificación utilizando la técnica anterior con los actuales límites establecidos en el laboratorio, con esta nueva técnica, se ha determinado que con la SPE se pueden obtener valores menores o iguales, del orden de los 0,03 ug/L, los cuales son óptimos para determinar estos contaminantes trazas.
- Estos valores de LD y LC de las curvas de calibración garantizan la detección de estos HAPs a niveles más bajos que los permitidos por la legislación nacional y las guías internacional, lo cual, permite llevar un control eficiente de estos Contaminantes.
- Parte de los analitos estudiados pertenecen a listas prioritarias de carcinogénicos y contaminantes, por sus efectos sobre el medioambiente y el ser humano, por lo que sus estudios y análisis son prioritarios para disminuir su exposición.
- Es necesario por parte de los legisladores nacionales, estableces mayores normativa en el área de Aguas de consumo, sólo existe una Norma de Calidad Primaria en aguas superficiales donde se establece un máximo al Benzo(a)pireno, pero es necesario una mayor regulación de estos contaminantes en todas las matrices, ya que se ha establecido con claridad sus efectos nocivos para la salud.

V. REFERENCIAS

- Adonis, M. 1999. Urban air pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons in Santiago, Chile. Levels, DNA adducts, genotoxicity and CYP1A induction. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy.
- Adonis, M., Gil, L. 2000. Ratatán en un Mundo Contaminado. Tomo I y II. Editorial LOM Ediciones Ltda. ISBN 956-288-642-5.
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). 1995. Reseña toxicológica de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.
- Basel, A. 2002. Natural attenuation: How is mother nature aiding us to cleanse our environmental sins. Practice Periodical of Hazardous, toxic, and Radioactive waste Management. 6: 139-140.
- Bjorseth, A. y Ramdahl, T. 1985. Handbook of Polycyclic aromatic hydrocarbons, Emission Sources and Recent Progress in Analytical Chemistry, Volumen 2. pp.113. Marcel Dekker, New York.
- Blumer, M. y Youngblood, W. 1975. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils and recent sediments. Science. 188:53-55.
- Bonert, C. y R. Dorión. 1989. Estudio de niveles de hidrocarburos policíclicos aromáticos dispersos/disueltos superficiales en la bahía de Concón. Biología Pesquera, 18: 109-114.

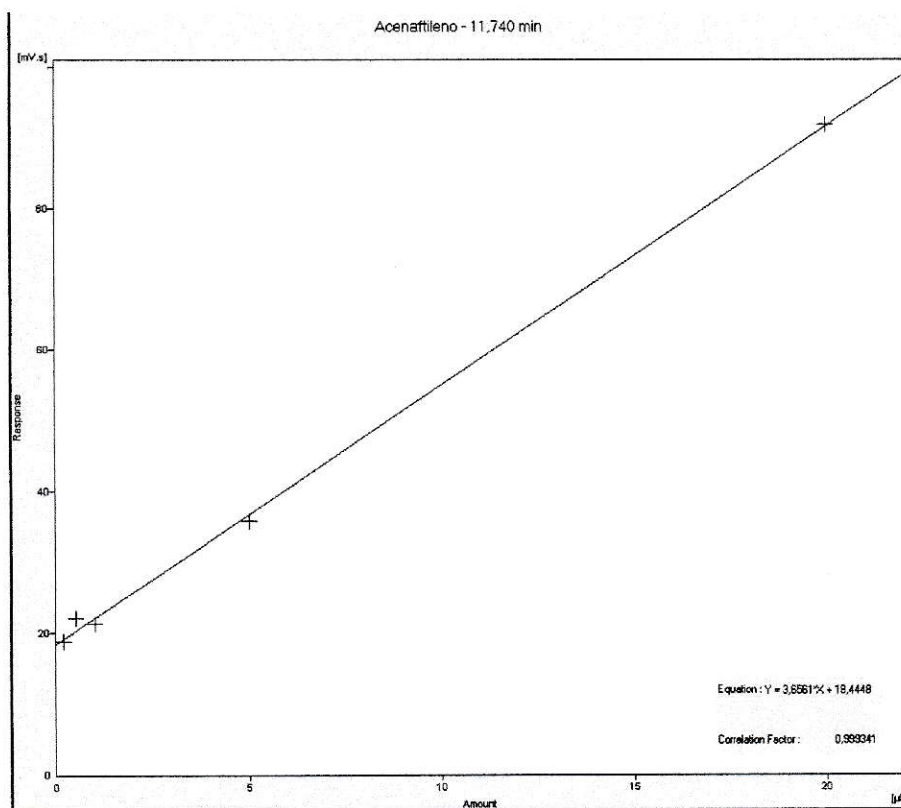
- Chiou, C.T., McGroddy, S.E., Kile, D.E., 1998. Partition characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils and sediments. *Environmental Science and technology*. 32 (2): 264-269.
- Conte, P., Zena, A., Pilidis, G., Piccolo, A. 2000. Increased retention of polycyclic aromatic hydrocarbon in soils induced by soil treatment with humic substances. *Environmental pollution*. 112: 27-31.
- Domenech, X. 1996. Contaminantes Atmosféricos – Aspectos químicos en Tecnología medioambiental. Universidad de Burgos. pp 105-113.
- EU.2005. Directiva 2004/107/EC del Parlamento Europeo y del Consejo, del 15 de Diciembre de 2004, relativa al arsénico, cadmio, mercurio, níquel e hidrocarburos aromático policíclicos en el aire ambiente. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 23, p. 3 (26-1-2005)
- Filipkowska, A. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons analysis in different matrices of the marine environment, Poland.
- Jaramillo, M. Reseña toxicológica de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, *Revista de salud pública sobre sustancias peligrosas y sus efectos sobre la salud*, España, 1993.
- Jaward, F.M., Barber, J.L., Booij K., Jones K.C. 2004. Spatial distribution of atmospheric PAHs and PCNs along a north south Atlantic transect. *Environmental Pollution* 132: 173-181.

- Loraine, G.A., Pettigrove, M.E. 2006. Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in southern California. *Environmental Science and Technology*. 40: 687-695.
- McBride, M.B. 1994. *Environmental Chemistry of soils*. Oxford University Press. pp 406
- Miller, J. 4° Ed. 2002. *Estadística y quimiometría para química analítica*. Editorial Pearson Educación.
- Prince, R.G. y Drake, E.N. 1999. Transformation and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Adriano, D.C., Bollag, J.M., Frankenberger, W.T. y Sims (eds.). *Bioremediation of contaminated soils*. Agronomy series 37, ASA, CSSA, SSSA. pp 89-110. Madison, Wisconsin USA.
- Spivack S., G. Hurteau, A. Reilly, K. Aldours. 2001. CYP1B1 expression in human lung. *Drug Metabolism and Disposition*. 29: 916-922.
- Thurman E.M., Mills, M.S. 1998. *Solid-phase extraction. Principles and practice*. John Wiley, New York.
- Voparil, I.M., L.M. Mayer. 2000. Dissolution of sedimentary polycyclic aromatic hydrocarbons into the lugworm's (*Arenicola marina*) fluids digestive. *Environmental Science and Technology*. 34: 1221-1228.
- WHO 2003 Health Risks of Persistent Organic Pollutants from Long-Range Transboundary Air Pollution (www.who.int).
- Wilcke, W. y col. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in hydromorphic soils of the tropical metropolis Bangkok. *Geoderma* 91: 297-309.

- Wild, S.R. y Jones, K.C. 1995. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environmental Pollution* 88: 91-108.

VI. ANEXOS

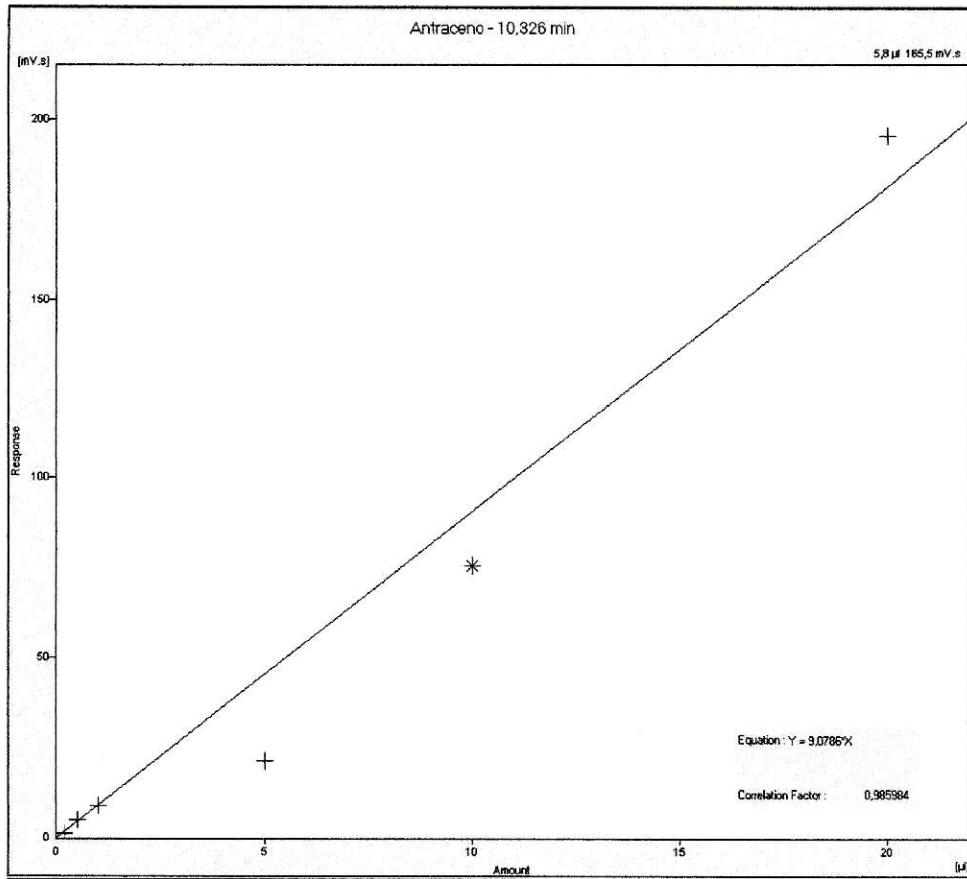
ANEXO 1: Curvas de Calibración de los 15 compuestos restantes, respuesta del equipo versus el valor de los 6 niveles de la curva de concentración



Curva de Calibración de Acenafileno

Coef. Correlación: 0,999341

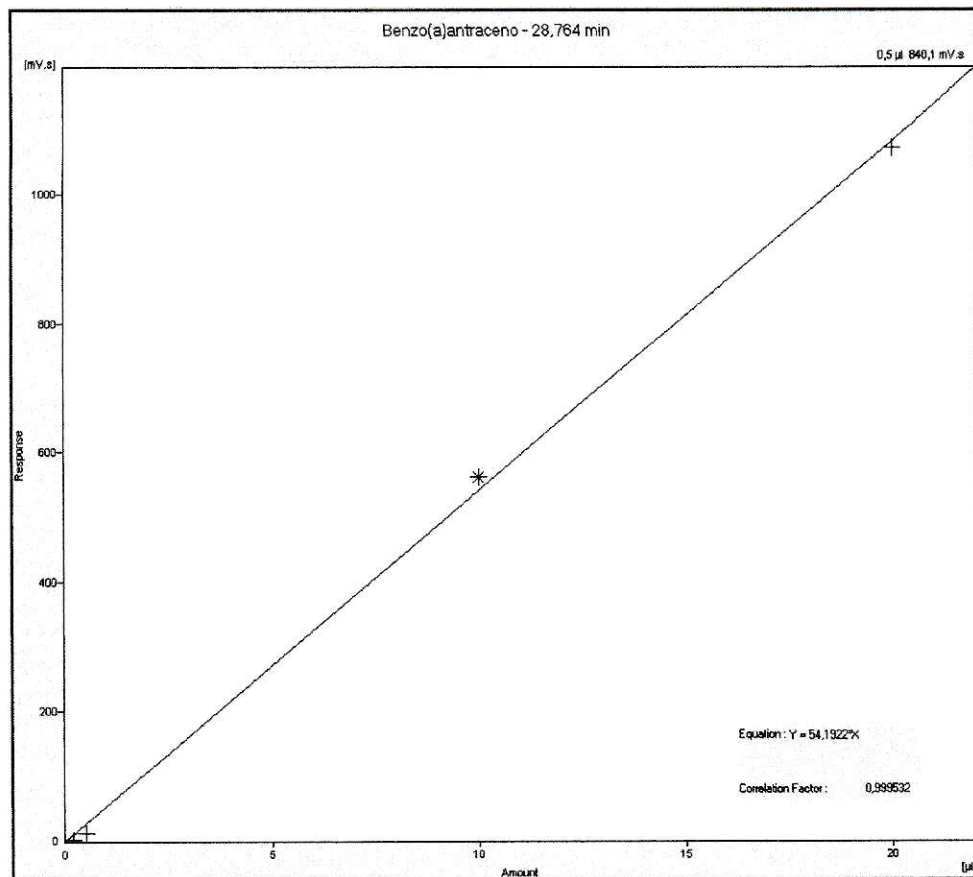
Ecuación: $Y = 3,6561 * X + 18,4448$



Curva de Calibración de Antraceno

Coef. Correlación: 0,985984

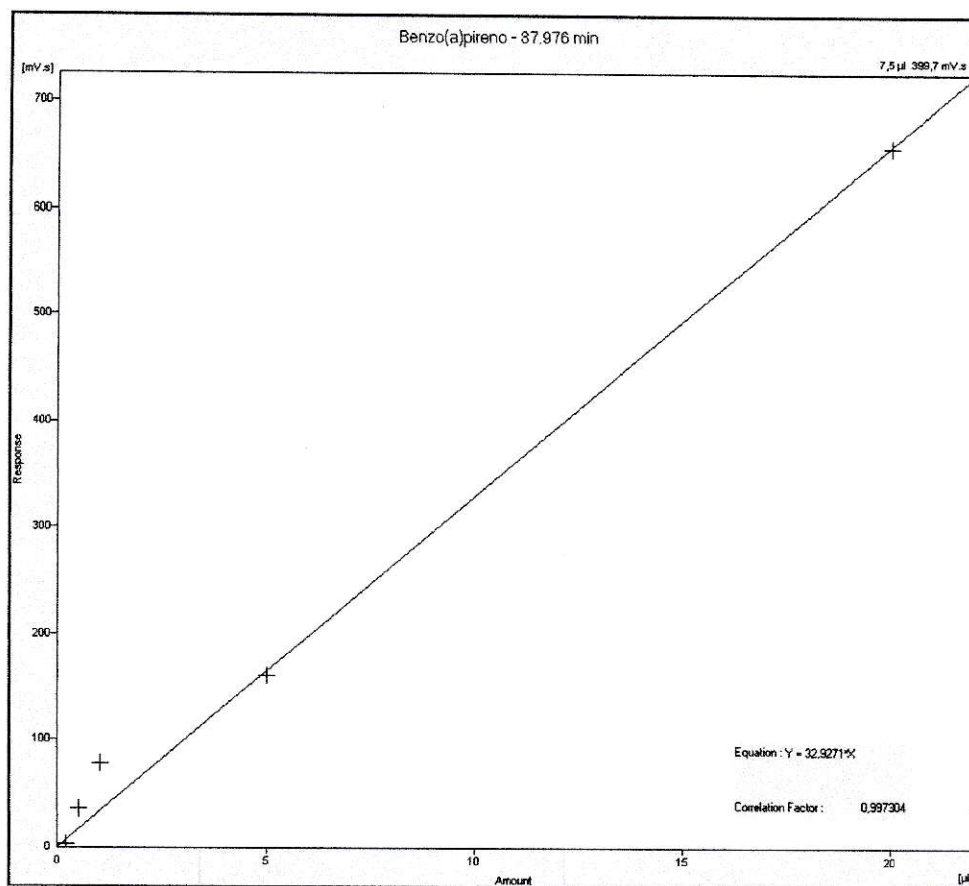
Ecuación: $Y = 9,0786 \cdot X$



Curva de Calibración de Benzo[a]antraceno

Coef. Correlación: 0,999532

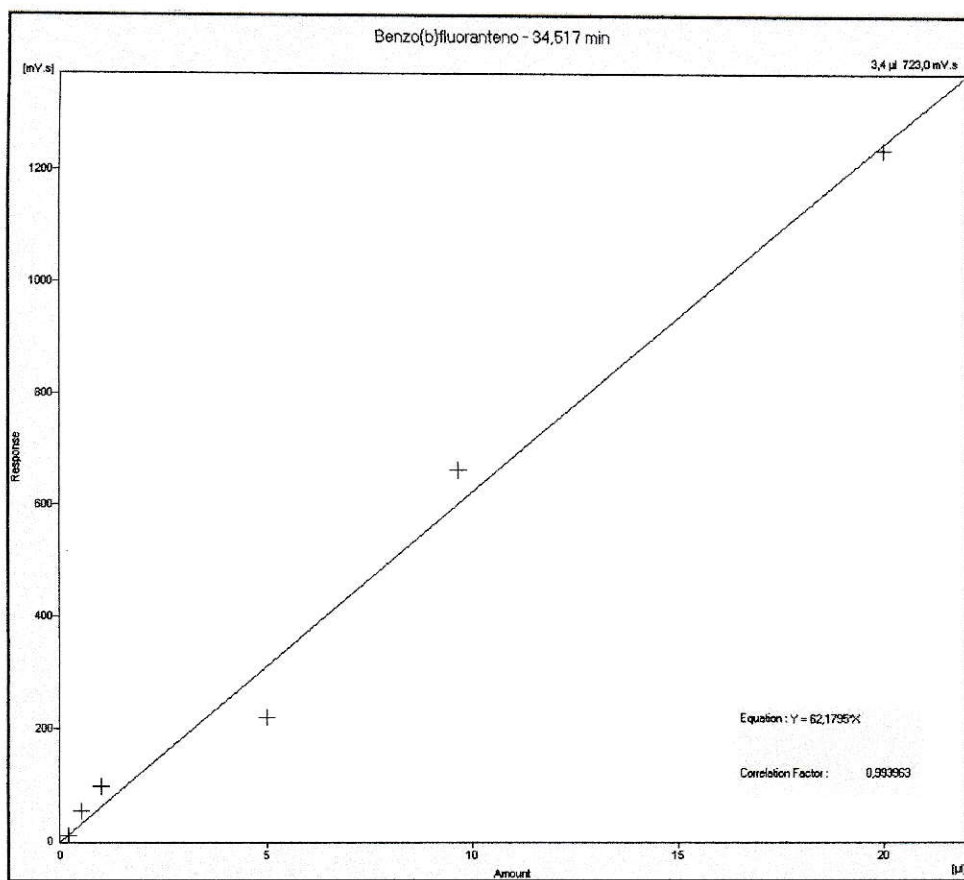
Ecuación: $Y = 54,1922 \cdot X$



Curva de Calibración de Benzo[a]pireno

Coef. Correlación: 0,997304

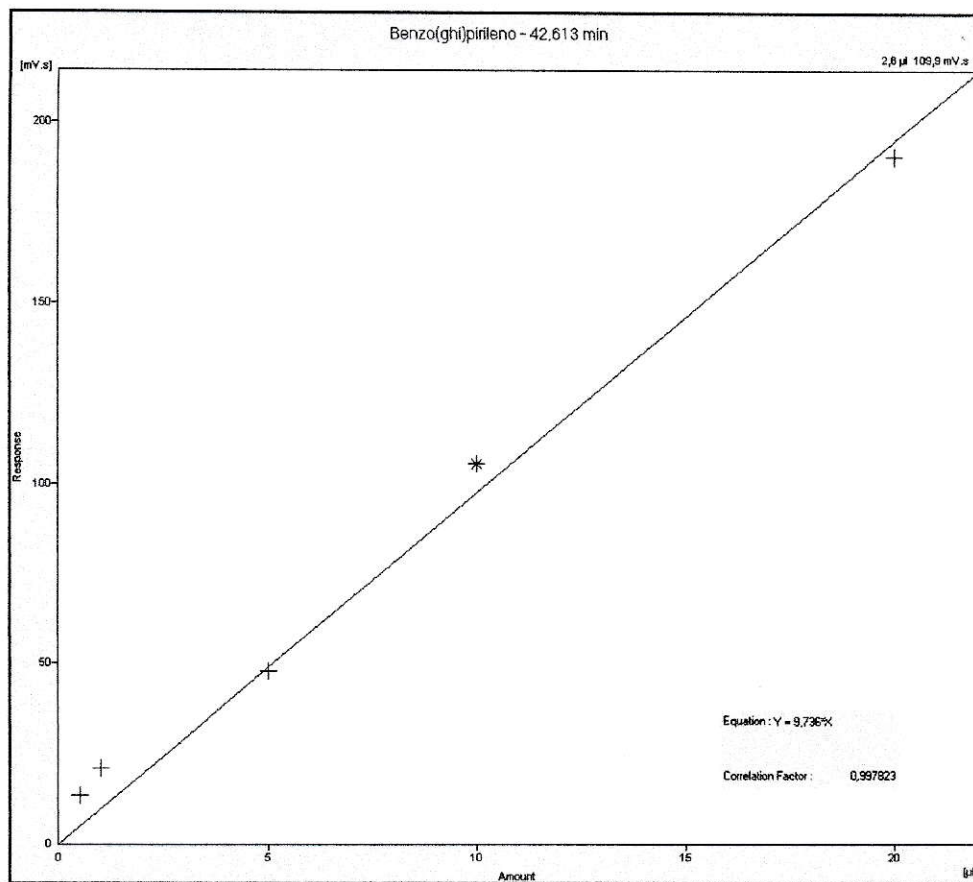
Ecuación: $Y = 32,9271 * X$



Curva de Calibración de Benzo[b]fluoranteno

Coef. Correlación: 0,993963

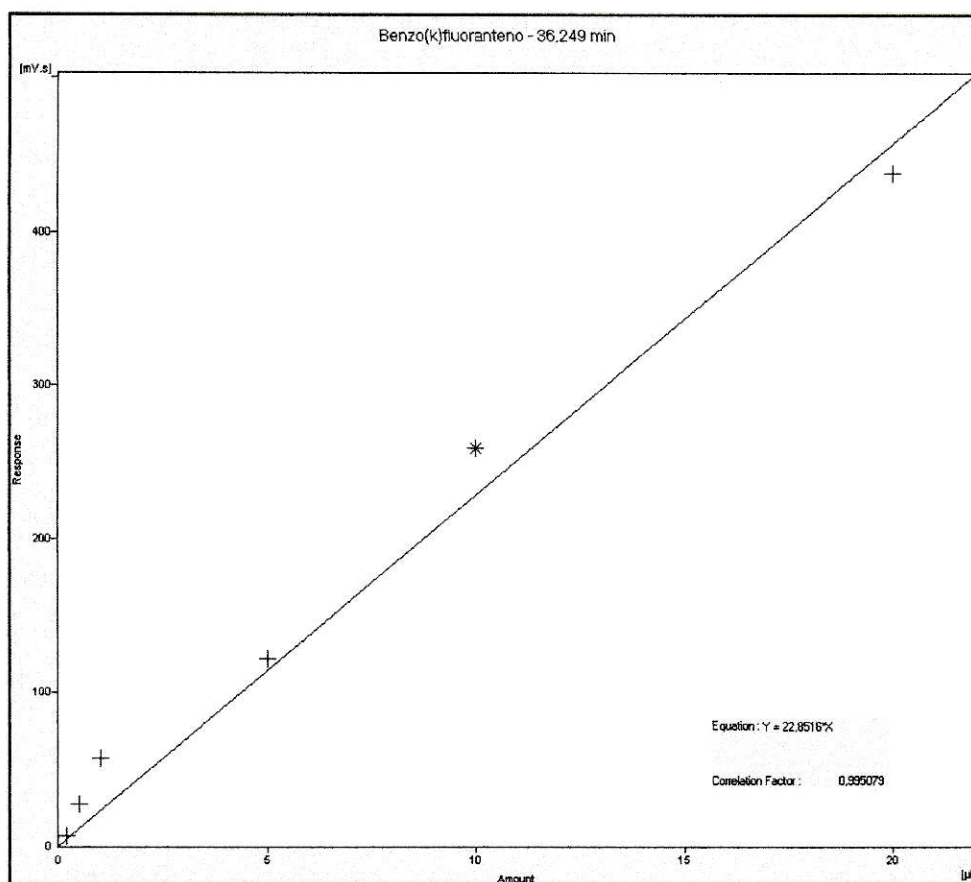
Ecuación: $Y = 62,1795 * X$



Curva de Calibración de Benzo[ghi]pirileno

Coef. Correlación: 0,997823

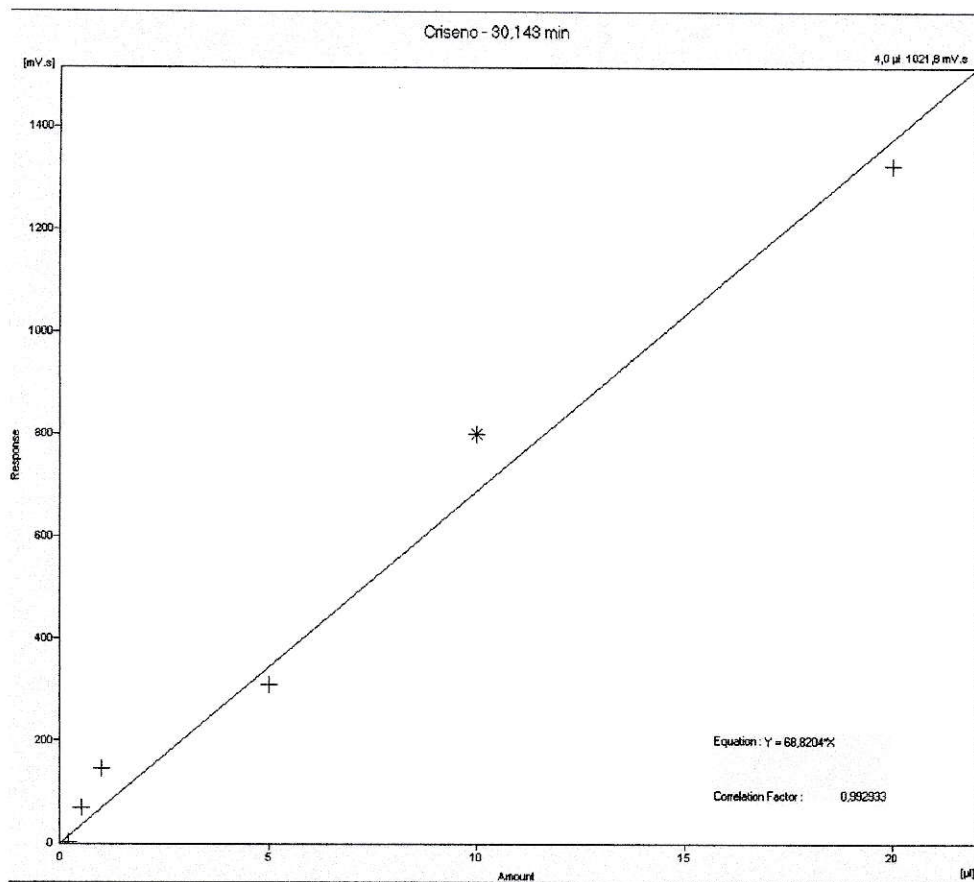
Ecuación: $Y = 9,736 * X$



Curva de Calibración de Benzo[k]fluoranteno

Coef. Correlación: 0,995079

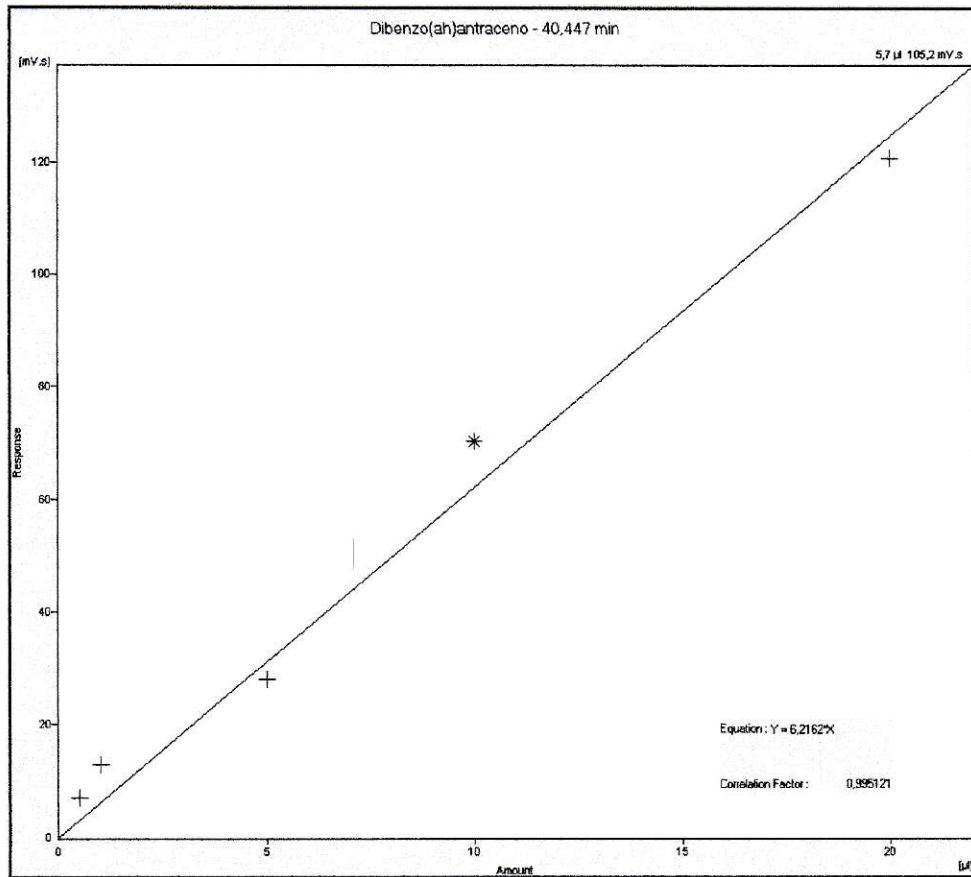
Ecuación: $Y = 22,8516 \cdot X$



Curva de Calibración de Criseno

Coef. Correlación: 0,992933

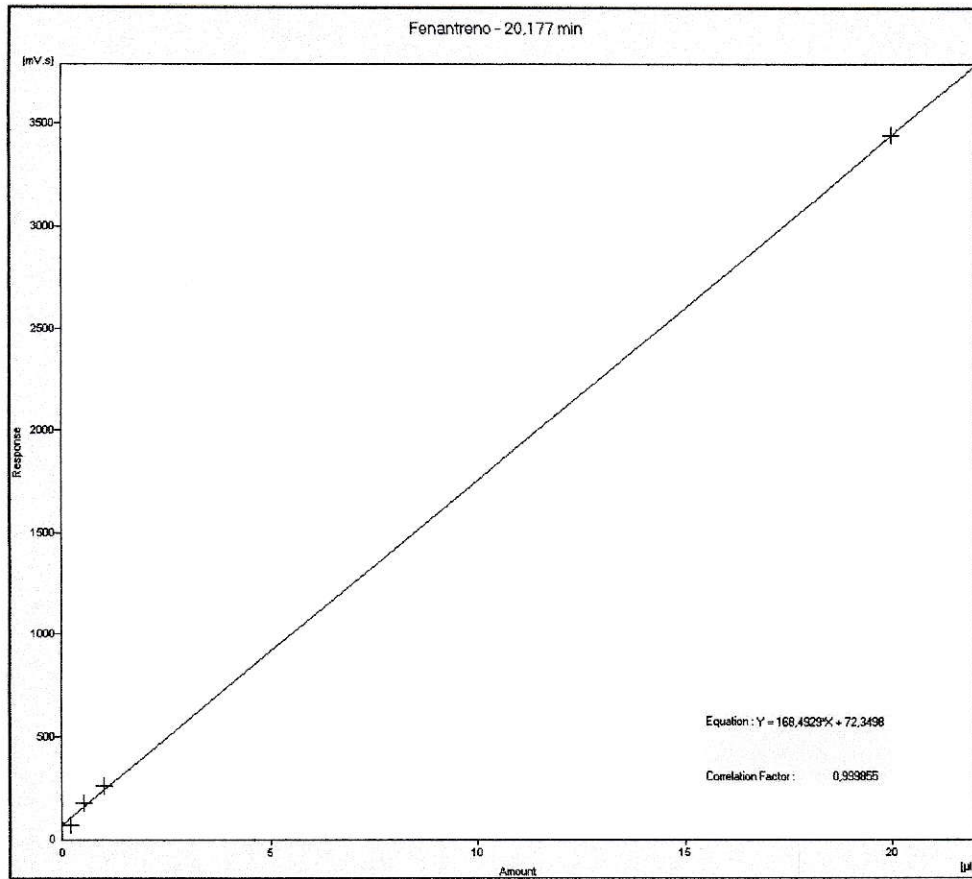
Ecuación: $Y = 68,8204 * X$



Curva de Calibración de Dibenzo[ah]antraceno

Coef. Correlación: 0,995121

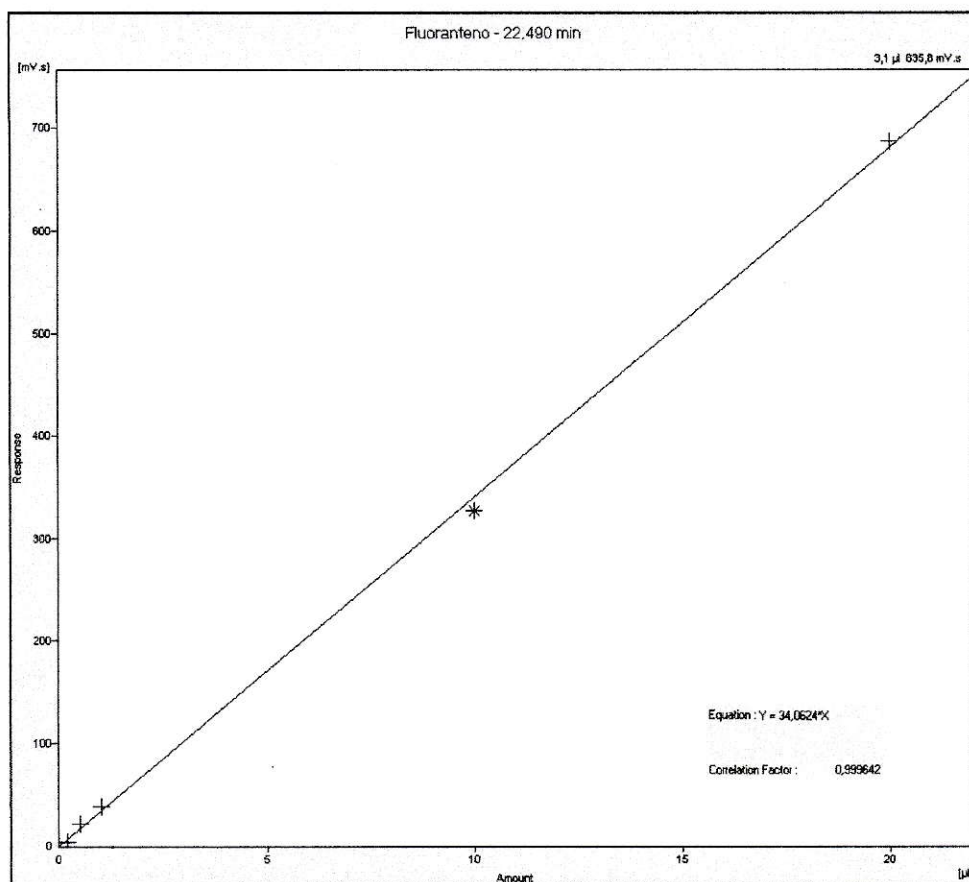
Ecuación: $Y = 6,2162 * X$



Curva de Calibración de Fenantreno

Coef. Correlación: 0,999855

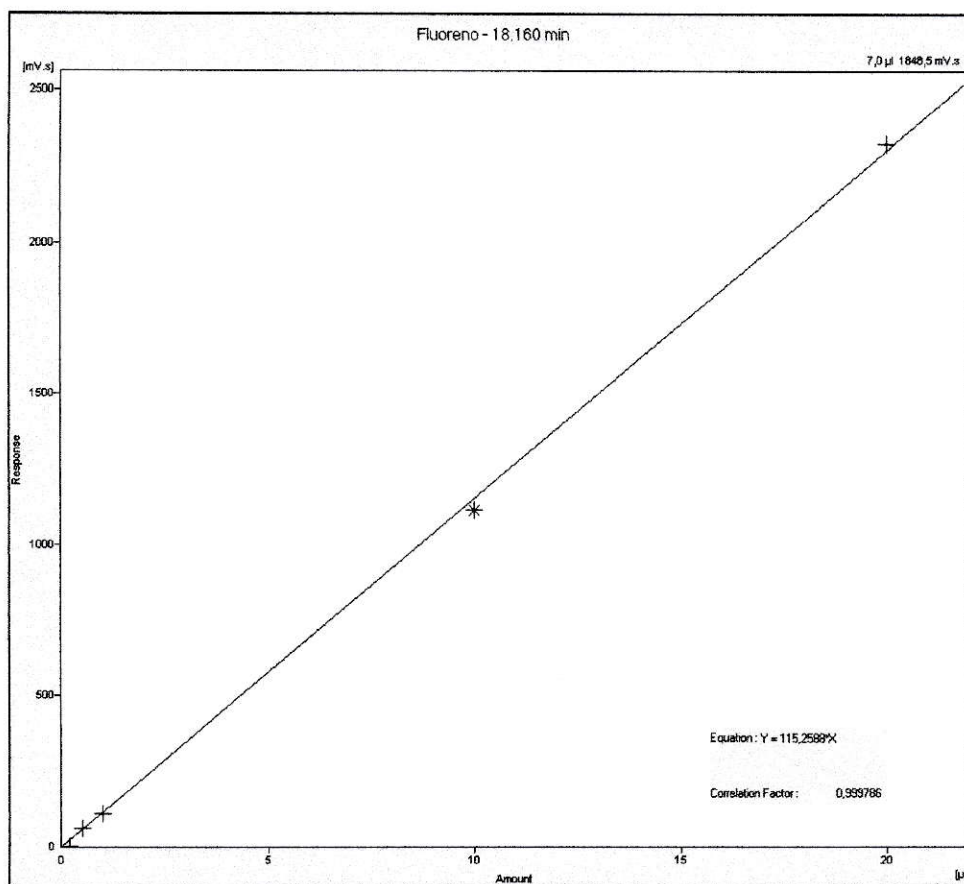
Ecuación: $168,49 \cdot X + 72,349$



Curva de Calibración de Fluoranteno

Coef. Correlación: 0,999642

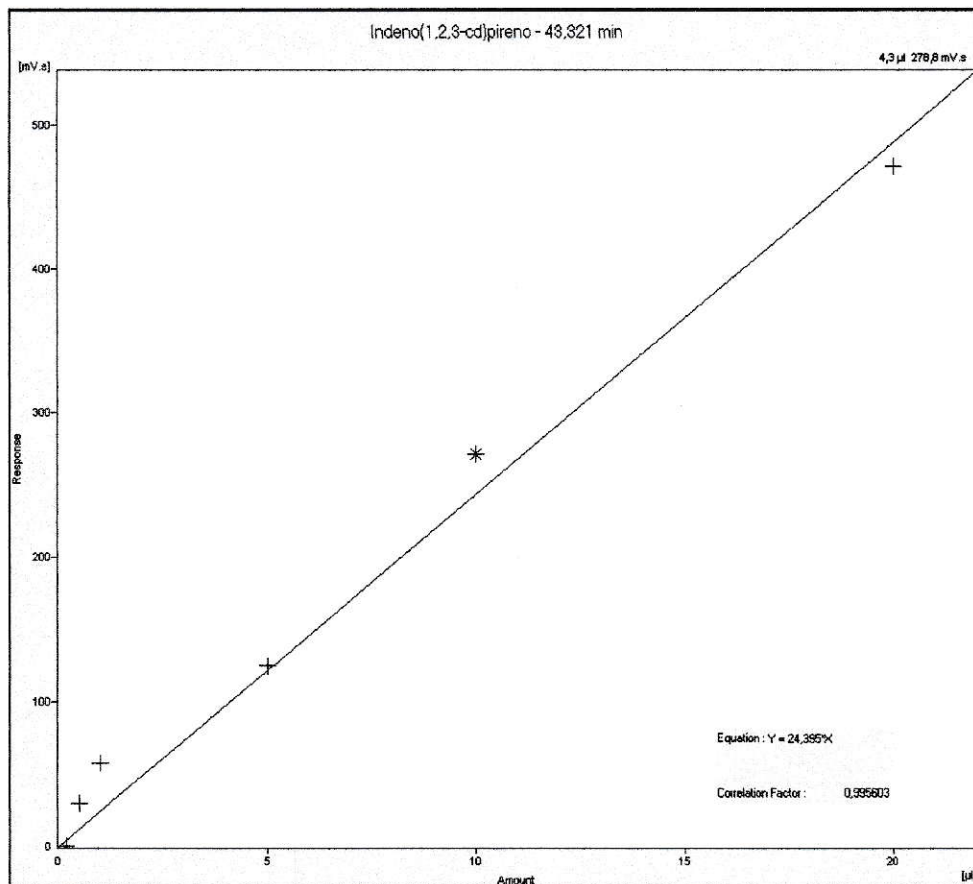
Ecuación: $Y = 34,0624 * X$



Curva de Calibración de Fluoreno

Coef. Correlación: 0,999786

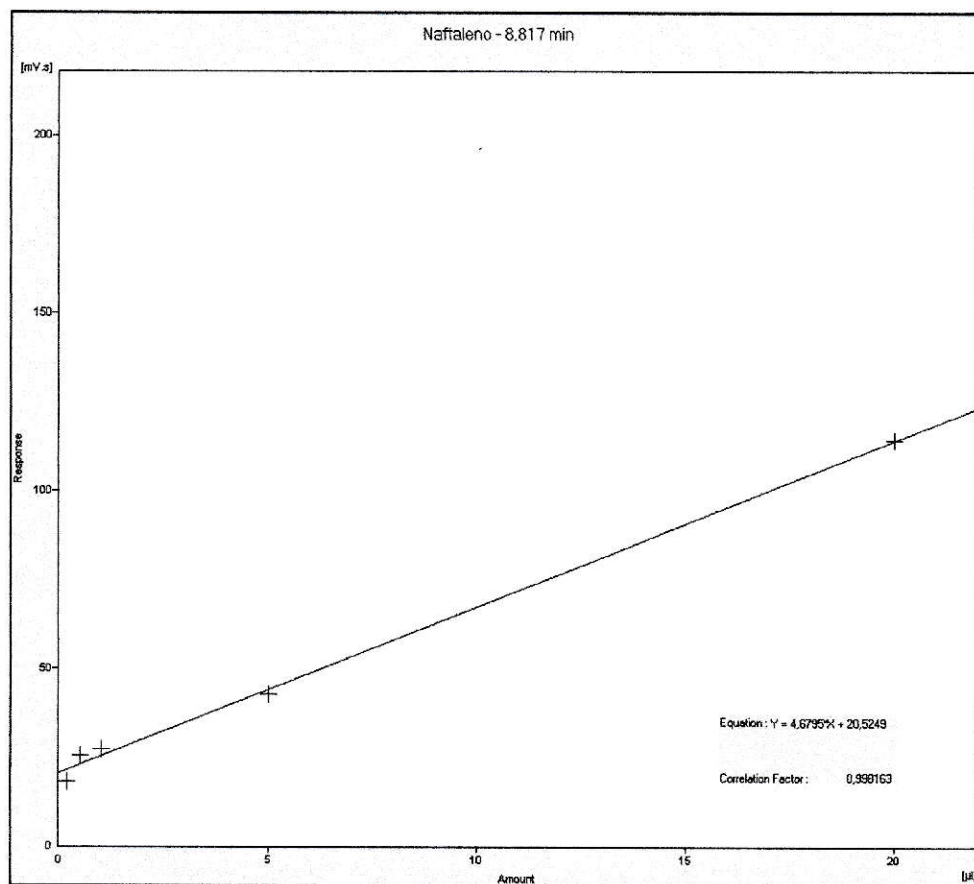
Ecuación: $Y = 115,2588 \cdot X$



Curva de Calibración de Indeno[123-cd]pireno

Coef. Correlación: 0,995603

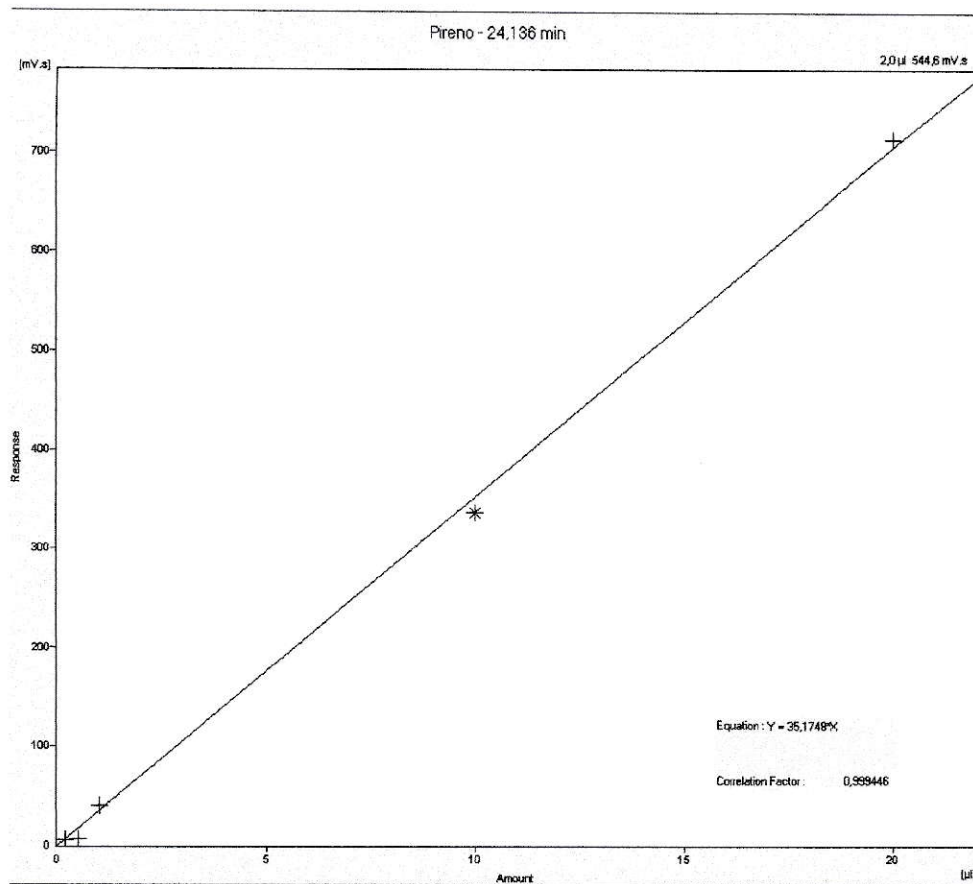
Ecuación: $Y = 24,395 * X$



Curva de Calibración de Naftaleno

Coef. Correlación: 0,998163

Ecuación: $Y = 4,6795 \cdot X + 20,5249$



Curva de Calibración de Pireno

Coef. Correlación: 0,999446

Ecuación: $Y = 35,1748 * X$

ANEXO 2: Manual SISS, Agua Potable, Verificación de desempeño de Métodos de ensayo para el análisis Físico-Químico de parámetros de calidad de agua potable.

Procedimiento Técnico

PT- 02 - 2007

Agua Potable – Procedimientos Técnicos – Parte 02:
Verificación de desempeño de Métodos de ensayo para el análisis Físico-Químico de parámetros de calidad del Agua Potable

1. OBJETIVO

Este procedimiento tiene por objeto describir la metodología a aplicar para llevar a cabo la verificación de desempeño de los métodos de ensayo físico-químicos descritos en este manual, seleccionados para efectuar los análisis de calidad del agua potable y de las aguas naturales que constituyen las fuentes de abastecimiento de los servicios.

2. ALCANCE

2.1 La verificación de desempeño consiste en evidenciar experimentalmente bajo las condiciones del propio laboratorio, que un método normalizado ha sido apropiadamente implementado y que por tanto es apto para su propósito, es decir que las características de desempeño son capaces de producir resultados de acuerdo con las necesidades del problema analítico. Para tal efecto y dado que se aplica a métodos normalizados, esta verificación incluye sólo algunos de los criterios de desempeño de la validación, conociéndose también como "validación parcial".

2.2 Este procedimiento se aplica a todos los métodos físico-químicos oficiales descritos en este manual, con la finalidad de evidenciar que se cumplen los requerimientos mínimos de desempeño analítico respecto de límite de detección o cuantificación, precisión y exactitud, exigidos por la autoridad, para que puedan ser utilizados en el análisis de agua potable y fuentes.

2.3 Este procedimiento deberá también ser aplicado por los laboratorios, para verificar el desempeño analítico de cualquier método alternativo cuyo uso sea solicitado a la autoridad. Es exigencia que el método alternativo que se desee introducir sea normalizado y de referencia internacional reconocida como son: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, ISO, EPA, AOAC, ASTM y NIOSH, todos en su última edición.

2.4 El organismo fiscalizador sólo autorizará métodos que cumplan con las exigencias antes descritas y que cuenten con registro completo de su verificación de desempeño, para tal efecto se deberá disponer del "Informe de Verificación de desempeño de Métodos de Ensayos F-Q" desarrollado de acuerdo a las pautas y formatos de registro contenidos en este procedimiento.

2.5 Este procedimiento no se aplica a otros métodos no normalizados, no estandarizados, modificados o desarrollados por el propio laboratorio. Bajo ninguna circunstancia y aun cuando hayan sido validados, la autoridad autorizará este tipo de métodos para el control del agua potable y sus fuentes de captación.

256

3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

3.1 Agua potable: Agua que cumple con los requisitos físicos, químicos y radioactivos y microbiológicos prescritos en la norma NCh 409/1 (última edición), que aseguran la inocuidad y aptitud para el consumo humano.

3.2 Ensayo: Operación técnica que consiste en la determinación de una o más características o comportamiento de un determinado producto, de acuerdo a un procedimiento especificado.

3.3 Exactitud: Cercanía o grado de acuerdo entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. Es una combinación de sesgo y precisión de un procedimiento analítico.

3.4 Fortificación: Acción de fortificar (dopar) intencionalmente, agregando cantidades conocidas del analito de interés, ya sea a muestras o a blancos de agua para análisis grado reactivo.

3.5 Límite de detección Instrumental IDL: Concentración de un constituyente que produce una señal mayor que tres veces la desviación estándar del nivel medio del ruido.

3.6 Límite de detección del método LDM: Concentración mínima del analito mayor que cero, que puede ser medida e informada con un 99% de confianza.

3.7 Límite de cuantificación del método LQM: Concentración más baja del analito que se puede determinar con un nivel aceptable de incertidumbre.

3.8 Material de referencia: Material que posee propiedades homogéneas y bien definidas, como para permitir su uso en la calibración de un instrumento o la evaluación de un método. Es MRC, si cuenta con un certificado que entrega trazabilidad e incertidumbre con un nivel de confianza dado.

3.9 Método: Manera ordenada y sistemática de realizar un ensayo.

3.10 Método analítico: Conjunto de operaciones específicas para caracterizar cualitativamente o cuantitativamente a un analito en una determinada muestra.

3.11 Precisión: Grado de concordancia entre resultados independientes de una misma muestra sometida a ensayo bajo condiciones de repetibilidad o de reproducibilidad.

3.12 Sesgo: Corresponde a la desviación del valor medido respecto del valor verdadero, causada por errores sistemáticos en el procedimiento.

3.13 Trazabilidad: Relación entre una medición y los valores de patrones nacionales internacionales o materiales de referencia.

3.14 Verificación: Confirmación mediante examen y aporte de evidencias objetivas que se han cumplido los requisitos especificados.

4. METODOLOGÍA

4.1 Criterios de desempeño analítico a verificar

El organismo fiscalizador Superintendencia de Servicios Sanitarios, ha determinado exigir para la verificación interna de desempeño de los métodos de ensayo físico-químicos, la determinación de los siguientes atributos:

- Determinación de límite de detección o de cuantificación, según corresponda al tipo de método.
- Determinación de precisión del método de ensayo.
- Determinación de exactitud del método de ensayo.

Los estadígrafos se deberán obtener experimentalmente bajo las condiciones propias de cada laboratorio, para cada parámetro de calidad de agua. Para efectos de las pruebas experimentales se deberá distinguir si el método es oficial o alternativo y proceder de la siguiente manera:

a) Métodos oficiales

En todos los métodos oficiales, la demostración es exigida para concentraciones cercanas a los valores normados por NCH 409/1 para los distintos parámetros, debiéndose cumplir con el mínimo exigido para cada atributo. Para el caso puntual de BTX, se deben tomar en cuenta las consideraciones especiales indicadas en ME-19-07.

Para evidenciar esta tarea, el laboratorio deberá disponer del "Informe de Verificación de desempeño de Métodos de Ensayos F-Q" y de los formatos de registro con toda la información experimental que lo sustenta. Lo anterior sin perjuicio que el sistema de aseguramiento de calidad propio del laboratorio determine efectuar adicionalmente controles en otros niveles de concentración, de manera de abarcar todo el rango de trabajo en que usualmente ocupa el método.

b) Métodos alternativos normalizados

Dado que estos también corresponden a métodos estandarizados, los atributos a determinar y criterios mínimos a cumplir para la verificación de desempeño interna, serán los mismos que para los métodos oficiales. Sin embargo en los métodos alternativos esta demostración es exigida para todo el rango de trabajo declarado para el método en los distintos parámetros, debiéndose realizar las pruebas experimentales para evidenciar la precisión y exactitud requerida a lo menos en tres niveles:

- Concentraciones cercanas al límite de detección/ cuantificación del método.
- Concentraciones cercanas a los valores normados por NCH 409/1.
- Concentraciones cercanas al valor superior del rango de trabajo declarado para el método por el laboratorio.

Para los métodos alternativos, el laboratorio interesado deberá presentar una solicitud formal a la SSS, acompañando todos los antecedentes respecto de la referencia bibliográfica de soporte del método de ensayo y el "Informe de Verificación de desempeño de Métodos de Ensayos F-Q", en las condiciones antes especificadas y desarrollado según las pautas de este procedimiento.

4.2 Ocasión en que se realiza la verificación de desempeño de los métodos

Las determinaciones de límites de detección, límites de cuantificación, precisión y exactitud deberán efectuarse al inicio de la implementación del método en el laboratorio, para demostrar que el método es apto para su propósito y que por tanto las características de desempeño se ajustan a los mínimos exigidos.

La determinación se debe realizar experimentalmente mediante la aplicación de cada método específico, con la participación de todos los analistas y equipos que trabajen en un determinado método. Ante cambios importantes en el desarrollo del método como son: cambio de equipo de medición final, cambio o incorporación de analistas o cualquier modificación del procedimiento del método de ensayo contemplada en la respectiva norma de referencia, todos los estadígrafos deberán recalcularse y cumplir nuevamente los niveles mínimos de exigencia. En todos los casos tal información se deberá mantener registrada a nivel del laboratorio.

4.3 Criterios para aceptar la verificación de desempeño de los métodos

El resultado de cada uno de los atributos límites de detección, límites de cuantificación, precisión y exactitud deberá cumplir los requerimientos mínimos de desempeño analítico exigidos para cada método de ensayo, que se encuentran expresamente especificados en la cláusula 10 del método particular de cada uno de ellos y que se resumen en la Tabla 8-1 y Tabla 8-2 del capítulo 8 de este Manual de métodos de ensayo para agua potable versión 2007.

Todos los métodos físico-químicos contenidos en este manual tienen los mismos criterios de exigencia respecto del atributo a considerar, con excepción de los métodos que utilizan técnicas cromatográficas correspondientes a determinación de sustancias orgánicas, plaguicidas, y algunos de los productos secundarios de desinfección, en los que en lugar de límite de detección del método se ha definido regular límite de cuantificación del método.

5. MANEJO ESTADÍSTICO

5.1 Cálculo de Límite de detección del método

El límite de detección del método se obtiene experimentalmente, mediante el análisis por el mismo procedimiento del método de ensayo, de al menos 7 repeticiones de blancos fortificados con el analito de interés. Para llevar a cabo la fortificación, se debe utilizar la solución estándar para cada analito, indicada en la cláusula 5: "Reactivos y Soluciones" de cada método de ensayo.

El límite de detección del método, es calculado a partir de la fórmula:

$$LDM = t \times S$$

Donde:

t= Estadígrafo t de Student para (n-1) grados de libertad, 90% de confianza y 1 cola (Anexo).
S= Desviación estándar de las mediciones de blancos fortificados.

El nivel de fortificación inicial es estimado como 2 a 5 veces el límite de detección instrumental IDL, calculado a su vez a partir del análisis de 7 blancos de agua grado reactivo sin fortificar.

$$IDL = 3 \times S$$

Donde:

S = Desviación estándar de las mediciones de los blancos.

Adicionalmente para comprobar si el valor obtenido para LDM es realmente aplicable para el método que se está verificando, se deberá cumplir el requerimiento de razón de conformidad $4 < R < 10$, donde R es la razón entre la media de las réplicas y el LDM calculado. Si R cae fuera del rango deberá repetirse la determinación experimental considerando, si fuese necesario, otro nivel de fortificación.

5.2 Cálculo de Límite de cuantificación del método

El límite de cuantificación del método se obtiene experimentalmente, mediante el análisis por el mismo procedimiento del método de ensayo, de al menos 7 repeticiones de blancos fortificados con el analito de interés. Para llevar a cabo la fortificación, se debe utilizar la solución estándar para cada analito, indicada en la cláusula 5: "Reactivos y Soluciones" de cada método de ensayo. El nivel de fortificación inicial es estimado a partir de IDL, de la misma forma ya mencionada en el punto anterior.

El límite de cuantificación del método, es calculado a partir de la fórmula:

$$LQM = 10 \times S$$

Donde:

S = desviación estándar de las mediciones de blancos fortificados.

Adicionalmente para comprobar si el valor obtenido para LQM es realmente aplicable para el método que se está verificando, se deberá cumplir el requerimiento de razón de conformidad $4 < R < 10$, donde R es la razón entre la media de las réplicas y el LQM calculado. Si R cae fuera del rango deberá repetirse la determinación experimental considerando, si fuese necesario, otro nivel de fortificación.

5.3 Cálculo de Precisión del método

5.3.1 La precisión de los métodos será controlada en términos de % de desviación estándar relativa, como precisión de repetibilidad o de reproducibilidad. El número mínimo de mediciones a considerar, es al menos 12 ensayos con muestras reales de agua potable que preferiblemente contengan en forma natural o en su defecto hayan sido fortificadas con el analito de interés en una concentración cercana al límite permitido para agua potable por la norma NCH 409/1 para el respectivo parámetro. Para llevar a cabo la fortificación, se debe utilizar la solución estándar para cada analito, indicada en la cláusula 5: "Reactivos y Soluciones" de cada método de ensayo.

El % de desviación estándar relativa, es calculado a partir de la fórmula:

$$\% \text{ RSD} = \frac{S}{C_M} \times 100$$

Donde:

S = Desviación estándar de la serie de mediciones de la muestra

C_M = Concentración media en la muestra (media de la serie de mediciones)

5.3.2 La precisión de los métodos de ensayo, cuya verificación de desempeño ha sido aceptada, se controlará en el tiempo durante el trabajo rutinario del laboratorio, mediante el control de duplicados en los distintos set de análisis. El límite de aceptación de las diferencias entre duplicados, deberá cumplir la exigencia mínima establecida para la precisión de cada método, en cada uno de los set de muestras analizadas.

5.4 Cálculo de Exactitud del método

La exactitud de los métodos se controlará de dos formas:

5.4.1 En términos de % de recuperación de material de referencia MR de concentración conocida, preparado por el propio laboratorio a partir de un patrón provisto por proveedor reconocido. El número mínimo de mediciones a considerar para el cálculo del % de recuperación será al menos 12 ensayos, con un material de referencia en una concentración cercana al límite permitido para agua potable por la norma NCH 409/1 para el respectivo parámetro.

El % de recuperación será calculado a partir de la fórmula:

$$\% R = \frac{C_{exp \text{ MR}}}{C_{t \text{ MR}}} \times 100$$

Donde:

C_{exp MR} = Concentración experimental del MR (media de la serie de mediciones)

C_{t MR} = Concentración teórica del MR

5.4.2 Cuando exista acceso a material de referencia certificado MRC en la matriz agua potable, provisto por centro de metrología química nacional o internacional, se exigirá además evidenciar el cumplimiento de una prueba de trazabilidad y el cálculo del sesgo.

5.4.2.1 Para la prueba de trazabilidad se deberá practicar un número mínimo de 7 mediciones del MRC sometido al mismo procedimiento del método de ensayo, comprobar la existencia de homogeneidad de varianzas entre varianza experimental y la varianza del MRC y luego obtener:

- t de Student experimental calculado a partir de la siguiente fórmula:

$$t \text{ exp.} = \frac{\bar{x} - x_0}{S/\sqrt{n}}$$

Donde:

\bar{x} = Media de replicados del laboratorio
 x_c = Valor del material de referencia certificado MRC
 S = Desviación estándar de la serie de mediciones del MRC
 n = Número de mediciones

- t de Student crítico, obtenido desde la tabla que se presenta en el Anexo de este procedimiento, con $(n-1)$ grados de libertad, 95% de nivel de confianza y distribución de 2 colas.

La equivalencia estadística entre la media de las mediciones practicadas por el laboratorio y el valor del MRC, se comprueba si " t de Student experimental", es menor que " t de Student crítico", para el nivel de confianza especificado.

5.4.2.2 El sesgo es calculado a partir de la fórmula:

$$b = \bar{x} - x_c$$

Donde:

b = Sesgo
 \bar{x} = Media de replicados del laboratorio
 x_c = Valor del material de referencia certificado MRC

El cálculo de sesgo se realiza para saber si este es positivo o negativo, además de aplicar las acciones inmediatas para disminuirlo, aún cuando se haya cumplido satisfactoriamente la prueba de trazabilidad.

5.4.3 La exactitud de los métodos de ensayo, cuya verificación de desempeño ha sido aceptada, se controlará en el tiempo durante el trabajo rutinario del laboratorio, mediante el control de recuperación de material de referencia MR en los distintos set de análisis. Los límites de control de aceptación inferior y superior de las recuperaciones, deberán cumplir la exigencia mínima establecida para la exactitud de cada método, en cada uno de los set de muestras analizadas.

6. INFORME Y REGISTRO DE RESULTADOS

6.1 El informe deberá contener la información indicada en formato de registro FR- PT 02- 2007: "Informe de Verificación de desempeño de métodos de ensayo F-Q", que se incluye en este procedimiento.

6.2 En formularios anexos elaborados a través de planilla Excel o mediante cálculo manual, se deberá presentar el detalle del cálculo de cada uno de los atributos y manejo estadístico de los resultados. Para ello utilizar los modelos de formato indicados en Anexo 1, 2 y 3 de este procedimiento.

7. REFERENCIAS

7.1 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA, AWWA, WEF. 21st edition 2005. Part.1010-B Statistics,1020 Quality Assurance,1030 Data Quality. Part. 1040 Method Development and Evaluation, B 4. Equivalency Testing.

7.2 Norma Canadiense DR-12-VMC Protocolo "Validación de métodos químicos".Revisión 2002.

7.3 OAA, DC-LE-05 Organismo Argentino de acreditación. "Validación de Métodos". Revisión 2003.

7.4 Eurachem-Citac "Guide to Method Validation and Related Topic. The Fitness for purpose of Analytical Methods". Edición 1998.

7.5 Eurachem-Citac "Guide to Traceability in Chemical measurement". Edición 2003.

7.6 NCh 2000 of.1995 "Gestión de calidad y aseguramiento de calidad.Vocabulario"

7.7 NCh 2725 of 2002 "Directrices para la aplicación de NCh – ISO 17025 en los laboratorios que realizan ensayos y análisis químicos".

ANEXO 3: Estadígrafo t de Student

two-tailed test	80%	90%	95%	98%	99%	99.7%
one-tailed test	90%	95%	97.5%	99%	99.5%	99.85%
df	t _{0,10}	t _{0,05}	t _{0,025}	t _{0,01}	t _{0,005}	t _{0,0015}
1	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	235,8
2	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	19,207
3	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	9,219
4	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	6,620
5	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	5,507
6	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	4,904
7	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,530
8	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	4,277
9	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,094
10	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	3,975
11	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	3,850
12	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,764
13	1,350	1,771	2,160	2,65	3,012	3,694
14	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,636
15	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	3,586
16	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,544
17	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,507
18	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,475
19	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,447
20	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,422
25	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,330
30	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,270
40	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,199
60	1,296	1,671	2,000	2,39	2,660	3,130
∞	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,000