

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**“DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS  
POLICÍCLICOS POR MEDIO DE EXTRACCIÓN  
HOMOGÉNEA LÍQUIDO-LÍQUIDO Y CROMATOLOGRAFÍA  
LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA EN MUESTRAS  
ACUOSAS PRÍSTINAS”**

**Presentada a la Universidad de Chile  
para optar al Grado de Doctora en Química**

**Por:**

**MASIEL CERÓN NECULPAN**

**Directora de Tesis**

**Dra. María Estrella Báez Contreras**

**Co-director**

**Ph.D. Jefferson Cardia Simões**

**SANTIAGO- CHILE**  
**2012**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN  
RESIDENCIA**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Residencia presentada por el candidato:

**MASIEL SUSANA CERÓN NECULPAN**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Residencia como requisito para optar al Grado de Doctora en Química, en el examen de defensa de Tesis rendido el día.....de ..... de 2012.

**Directores de Tesis:**

Dra. María Estrella Báez C. \_\_\_\_\_

Ph.D. Jefferson Cardia Simões \_\_\_\_\_

**Comisión Informante:**

Dr. Pablo Richter D. (Presidente) \_\_\_\_\_

Dra. Margarita Préndez B. \_\_\_\_\_

Dra. María Angelica Rubio C. \_\_\_\_\_

Dr. Francisco Cereceda B. \_\_\_\_\_

**ÑI PEWMA MEW GÜMAN**  
(Elicura Chihuailaf)

Ka mapu mülepun gümaken  
ñi pewma mew  
rofülenew ti pu wechun wenu  
ñi pu mawidantu mew  
Müte alütuwlay ti rüpu  
pu lamgen, pu peñi  
ka witrallen mülen tüfachi Ko  
mew, pifiñ  
Küpalelmu chi tamün Kallfü  
Kawell wirafkülen wiñotuan  
Kamapu küpan, welu ñi kümel  
kaley ñi piwke  
Eymün mew ta choyügen  
Femgechi duguafiñ taiñ ayin  
pu Che.

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONICYT por financiamiento a través de Beca D-21070556, at24090071, Beca de Asistencia a Congresos y Cursos Cortos y Beca Término de Tesis Doctoral 2011.

Al CECS por financiamiento estadía en *Climate Change Institute*, Maine, E.E.U.U. y apoyo económico estadía UFRGS.

Al CPC de la UFRGS, especialmente a su director *Ph.D.* Jefferson Simoes, por contribuir en la obtención y transporte de muestras IC-5; financiar estadía en UFRGS y apoyar este trabajo desde su inicio.

A CONADI por subsidio para especialización de indígenas, año 2010.

## TABLA DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	HIPÓTESIS .....	5
3.	OBJETIVOS .....	5
3.1.	Objetivo General.....	5
3.2.	Objetivos Específicos .....	5
4.	MARCO TEÓRICO.....	6
4.1.	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos .....	6
4.2.	Glaciares y Acumulación de Contaminantes.....	11
4.3.	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos y Antártica .....	16
4.4.	Determinación Analítica de HAPs en Muestras Acuosas .....	21
5.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
5.1.	Materiales.....	28
5.1.1.	Materiales y Reactivos .....	28
5.1.2.	Instrumentos y Equipos.....	29
5.1.3.	Muestras .....	29
5.1.4.	<i>Software</i> .....	32
5.2.	Métodos .....	33
5.2.1.	Determinación de HAPs .....	33
5.2.1.1.	Método Cromatográfico HPLC-DAD.....	33
5.2.1.2.	Parámetros de Calidad Analítica del Método Cromatográfico HPLC-DAD .....	35
5.2.2.	HLLE .....	36
5.2.2.1.	Estudio del Volumen de Extracto por Diseño <i>Doehlert</i> .....	37
5.2.2.2.	Estudio Exploratorio del Efecto de los Factores Experimentales en la Extracción 39	
5.2.2.3.	Optimización .....	42
5.2.2.4.	Parámetros de Calidad Analítica del Método HLLE-HPLC-DAD .....	44
5.2.3.	Método Cromatográfico HPLC-FLD.....	44
5.2.3.1.	Parámetros de Calidad Analítica de Método Cromatográfico HPLC-FLD .....	45
5.2.3.2.	Parámetros de Calidad Analítica de Método HLLE-HPLC-FLD .....	45
5.3.	Análisis de Muestras por HLLE-HPLC-FLD .....	46
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	47
6.1.	Método Cromatográfico HPLC-DAD .....	47
6.1.1.	HPLC-DAD .....	47
6.1.2.	Parámetros de Calidad Analítica del Método Cromatográfico HPLC-DAD.....	51
6.2.	Extracción Homogénea Líquido-Líquido HLLE. ....	53

6.2.1.	Estudio del Volumen de Extracto por Diseño <i>Doehlert</i> .....	54
6.2.2.	Estudio Exploratorio del Efecto de los Factores Experimentales en la Extracción...	58
6.2.3.	Optimización HLLE-HPLC-DAD .....	63
6.3.	Método Cromatográfico HPLC-FLD.....	78
6.3.1.	HPLC-FLD .....	78
6.3.2.	Parámetros de Calidad Analítica de Método Cromatográfico HPLC-FLD .....	83
6.4.	HLLE-HPLC-FLD .....	86
6.5.	Análisis de Muestras.....	91
7.	CONCLUSIONES .....	101
8.	REFERENCIAS .....	103

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1.	HAPs en estudio y sus principales características físicas, químicas y biológicas. ....	1
Tabla 2.	Descripción de muestras de testigo de hielo IC-5. ....	32
Tabla 3.	Parámetros instrumentales para detector PDA 996, bomba W600 y software utilizados.....	34
Tabla 4.	Matriz de diseño <i>Doehlert</i> para volumen de cloroformo recuperado en el extracto. ....	38
Tabla 5.	Concentraciones en curva de calibración preparadas a partir de ME2. ....	40
Tabla 6.	Efecto de los factores experimentales en la extracción: matriz de diseño experimental. ....	41
Tabla 7.	Optimización: matriz de diseño factorial a 3 niveles para 3 factores. ....	43
Tabla 8.	Parámetros instrumentales para detector FLD, bomba W600 y software utilizados. ....	45
Tabla 9.	Programa en gradiente agua: acetonitrilo utilizado para la separación cromatográfica. ....	47
Tabla 10.	Tiempos de retención y longitud de onda para la cuantificación .....	50
Tabla 11.	Límites de detección LD y de cuantificación LC para HPLC-DAD. ....	52
Tabla 12.	Parámetros de ecuación de regresión de calibración y sensibilidad analítica para HPLC-DAD. ....	53
Tabla 13.	Matriz decodificada y volumen de cloroformo recuperado en el extracto. ....	55
Tabla 14.	Matriz de diseño experimental y valores de D para recuperación simultánea de 15 HAPs.....	59
Tabla 15.	Porcentajes de extracción de cada HAP en los experimentos del estudio exploratorio.....	62
Tabla 16.	Porcentajes de extracción promedio, mínimo y máximo para cada compuesto en estudio .....	63
Tabla 17.	Matriz utilizada en diseño factorial a 3 niveles para los 3 factores estudiados decodificados, volumen de extracto y $D_{\text{observado}}$ obtenidos en cada caso .....	65
Tabla 18.	Porcentajes de extracción de cada compuesto en cada experimento de optimización del método .....	71
Tabla 19.	Resumen de los factores optimizados y codificados .....	72
Tabla 20.	Recuperaciones máximas y mínimas obtenidas para cada HAP en estudio en etapa de optimización.....	73
Tabla 21.	Concentraciones en extracto, porcentajes de recuperación y factores de enriquecimiento para cada HAP en estudio en etapa de optimización con condiciones óptimas. ....	74
Tabla 22.	Parámetros de calidad analítica del método de HLLE-HPLC-DAD. ....	76
Tabla 23.	Límites de detección y de cuantificación obtenidos estadísticamente y experimentalmente .....	77
Tabla 24.	Porcentajes de recuperación de cada compuesto, desviación estándar relativa y factor de enriquecimiento correspondiente. ....	78
Tabla 25.	Programa de elución en gradiente para la columna Inertsil ODS-P.....	79
Tabla 26.	Tiempos de retención y longitudes de onda de excitación y de emisión para la cuantificación de HAPs mediante HPLC-FLD.....	80

Tabla 27. Parámetros de la ecuación de regresión para la calibración, sensibilidad analítica, límites de detección y cuantificación para la determinación de HAPs mediante HPLC-FLD.....	84
Tabla 28. Parámetros de la ecuación de regresión para la calibración, sensibilidad analítica, límites de detección y cuantificación para la determinación de HAPs mediante HLLE-HPLC-FLD. ....	89
Tabla 29. Porcentajes de Recuperación, desviación estándar y factor de enriquecimiento para la determinación de HAPS mediante HLLE-HPLC-FLD. ....	90
Tabla 30. Curvas de calibración utilizadas para cada compuesto en estudio .....	92
Tabla 31. Resultados de la determinación por HPLC-HPLC-FLD de HAPs en las muestras de testigos de hielo.....	94
Figura 1 Estructuras químicas de HAPs declarados prioritarios por <i>US EPA</i> .....	9
Figura 2. Elementos de un glaciar .....	12
Figura 3. Concentraciones de HAPs totales encontradas por año en glaciar, Monte Everest .....	15
Figura 4. Travesía terrestre desde <i>Patriot Hills</i> hasta el Polo Sur.....	17
Figura 5. Flujo de HAPs en ambiente marino antártico .....	18
Figura 6. Esquema del proceso de HLLE.....	26
Figura 7. Representación esquemática del sistema de fusión utilizado.....	30
Figura 8. Biblioteca de Espectros UV para los 15 HAPs estudiados por HPLC-DAD. ....	49
Figura 9. Porcentaje de recuperación de cloroformo en función del volumen adicionado.....	56
Figura 10. Carta Pareto para el diseño <i>Doehlert</i> de recuperación de Cloroformo.....	57
Figura 11. Carta Pareto del diseño experimental.....	60
Figura 12. Carta Pareto para respuesta única D observado, correspondiente a la función de conveniencia establecida para las múltiples respuestas.....	66
Figura 13 Superficie de respuesta obtenida en la optimización de la extracción de 15 HAPs por HLLE. ..	67
Figura 14. Carta Pareto para Naftaleno .....	69
Figura 15. Carta Pareto para Indeno[1,2,3-cd]pireno.....	69
Figura 16. Gráfico de Interacciones para Naftaleno.....	70
Figura 17. Gráfico de interacciones para Indeno[1,2,3-cd]pireno.....	70
Figura 18. Cromatogramas para multiestándar de 2,6 ng mL <sup>-1</sup> .....	82
Figura 19. Curvas de calibración para Indeno[1,2,3-c,d]pireno y Benzo[k]fluoranteno .....	85
Figura 20. HAPs en muestras de testigo de hielo de antártica.....	95
Figura 21. HAPs totales en IC-5 .....	95
Figura 22. Cromatogramas de uno de los blancos utilizado en la medición de las muestras del IC-5 .....	96
Figura 23. Cromatogramas de la muestra M81-90a .....	97

## **Resumen**

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son una familia de más de 100 compuestos orgánicos; presentan al menos dos anillos aromáticos fusionados y son derivados principalmente de la combustión incompleta de biomasa y combustibles fósiles. Son ubicuos y su formación, fuentes y depositación son ampliamente estudiadas. En este contexto, es muy relevante su control en muestras ambientales. La presencia de los HAPs en diferentes matrices de Antártica y Groenlandia (suelos, sedimentos, nieve y agua de mar) ha sido detectada en niveles muy bajos de concentración. Debido a los niveles del orden de ultratrazas de estos compuestos en matrices acuosas de zonas remotas, las etapas de extracción y pre-concentración son requeridas previo a su determinación analítica. La extracción homogénea líquido-líquido (HLL) constituye un método promisorio en cuanto a exactitud y precisión y presenta una serie de ventajas de tipo práctico (simple, tiempos cortos de extracción, bajo costo y uso de pequeños volúmenes de solvente) y entre ellas destaca la posibilidad de usar pequeños volúmenes de muestra, como los obtenidos en sistemas de fusión en continuo con muestreo discreto de testigos de hielo; dichas muestras son homogéneas y permiten obtener alta resolución temporal para el estudio de composición química en testigos de hielo.

El objetivo de esta investigación fue desarrollar una metodología analítica basada en HLL apropiada para el estudio de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras acuosas prístinas obtenidas desde un testigo de hielo de Antártica.

En HLL los analitos son extraídos desde una solución homogénea en un pequeño volumen de fase sedimentada, formada por el fenómeno de separación de fases, en un sistema de componentes ternarios. La metodología de extracción se desarrolló y optimizó mediante técnicas de diseño multivariado utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia con detección de arreglo de diodos (HPLC-DAD) para, posteriormente, validar el método de determinación de los compuestos por cromatografía líquida de alta eficiencia con detección de fluorescencia (HPLC-FLD), a fin de obtener límites de

detección y cuantificación apropiados, de acuerdo a los niveles de concentración esperados en las muestras. La extracción desde muestras acuosas muy diluidas se realizó por adición de una mezcla de cloroformo y metanol y agitación manual por 30 segundos. La separación de fases fue por adición de NaCl, recuperándose el extracto (fase sedimentada) por centrifugación. Aplicando un diseño factorial a tres niveles con tres factores ( $3^3$ ) se establecieron las condiciones óptimas de extracción y determinación simultánea para naftaleno, fenantreno, antraceno, benzo[k]fluoranteno, benzo[b]fluoranteno acenaftileno, fluoreno, fluoranteno, benzo[a]pireno (BaP), benzo[g,h,i]perileno, dibenzo[a,h]antraceno, indeno[1,2,3-c,d]pireno, (BghiP) acenafteno, pireno y criseno. Las condiciones óptimas de extracción fueron: 10% m/v de NaCl, 1,2 mL de  $\text{CH}_3\text{OH}$  y 120  $\mu\text{L}$  de  $\text{CHCl}_3$  (solvente extractante) para 3,5 mL de muestra. Los factores de enriquecimiento logrados fluctuaron entre 32 y 43 en el intervalo 8-50  $\text{ng mL}^{-1}$  para la metodología HLLE-HPLC-DAD y desde 34 a 49 en el intervalo 0,03-0,11  $\text{ng mL}^{-1}$  para HLLE-HPLC-FLD. Las recuperaciones de los HAPs bajo las condiciones óptimas a niveles de concentración de 20  $\text{ng mL}^{-1}$  fluctuaron entre 67 y 92%, con desviaciones estándar relativas entre 0,7 y 5,1 %. Para la detección por fluorescencia las recuperaciones variaron entre 71 y 99 % en el intervalo de concentraciones de 0,048-0,130  $\text{ng mL}^{-1}$ , con desviaciones estándar relativas entre 1,1 y 9,9%.

Para HLLE-HPLC-FLD la sensibilidad analítica/ límites de detección/ límites de cuantificación estuvieron entre 0,0078/ 0,0203/ 0,0676  $\text{ng mL}^{-1}$  para fluoranteno y 0,0006/ 0,0015/ 0,0051  $\text{ng mL}^{-1}$  para antarceno. Un comportamiento lineal para la extracción fue establecido, con valores de  $R^2$  entre 0,9654 para fluoranteno y 0,9998 para antraceno. La aplicación de HLLE-HPLC-FLD en muestras acuosas prístinas, correspondientes a secciones de un testigo de hielo, permitió la detección y cuantificación en el orden de los  $\text{pg mL}^{-1}$  de la mayoría de los analitos (menos BaA y coroneno) en las muestras, encontrándose diferencias a diferentes profundidades al considerar el total de HAPs estudiados.

## Summary

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a family of over 100 organic compounds, having at least two fused aromatic rings. They are derived mainly from the incomplete combustion of fossil fuel and biomass. PAHs are ubiquitous and their formation, sources and fate have been extensively reviewed. In this context their control on environmental samples is highly relevant. The presence of PAHs in various matrices in Antarctica and Greenland (soil, sediment, snow and sea water) has been detected at very low concentrations levels. According to the ultra-trace levels in aqueous matrices from remote areas an extraction and pre-concentration step, prior to the analytical determination is required. Homogeneous liquid-liquid extraction (HLLE) is a promising method for the determination of organic compounds in aqueous matrices because of its accuracy and precision. In addition it presents several practical advantages (simple, with short extraction times, low cost and use of small volumes of solvent). This technique allows using small sample volumes, such as those attained from continuous ice core melter system with discrete sampling for different chemical analysis. These samples are homogeneous and provide a high temporal resolution for the study of ice core chemical composition.

The objective of this research was to develop an analytical methodology based on HLLE appropriate for the study of polycyclic aromatic hydrocarbons in pristine aqueous samples obtained from an ice core of Antarctic.

In HLLE analytes are extracted from a homogeneous solution in a small volume of sedimented phase formed by a phase separation phenomenon in a ternary component system. The extraction methodology was developed and optimized using multivariate design by using high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) for the analytical determination of PAHs. In a second stage the method was validated for the determination of compounds by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD) in order to achieve the appropriate limits of detection (LODs) and quantification (LOQs) according to the

possible concentration levels of samples. The extraction from very dilute aqueous samples was performed by adding a mixture of chloroform and methanol and manual shaking for 30 seconds. Phase separation was performed by adding NaCl and the extract (sedimented phase) was recovered by centrifugation. The optimization was carried out by applying a three-level factorial design with three factors ( $3^3$ ) for the simultaneous extraction and analytical determination of 15 PAHs from water samples: naphthalene, phenanthrene, anthracene, acenaphthylene, fluorene, fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[b]fluoranthene, benzo[a]pyrene, acenaphthene, benzo[g,h,i]perylene, chrysene, pyrene, dibenzo[a,h]anthracene and indeno [1,2,3-c,d] pyrene. Optimal conditions were: 10% w/v of NaCl, 1.2 mL of CH<sub>3</sub>OH and 120 µL of CHCl<sub>3</sub> (extracting solvent) for 3.5 mL of sample.

The enrichment factors obtained were between 32 and 43 in the range 8-50 ng mL<sup>-1</sup> for the HLLC-HPLC-DAD methodology and from 34 to 49 in the range 0.03-0.11 ng mL<sup>-1</sup> for HLLC-HPLC-FLD. Recoveries under optimal conditions for a PAHs concentration levels of 20 ng mL<sup>-1</sup> varied between 67 and 92% with a relative standard deviation between 0.7 and 5.1 %. For fluorescence detection mean recoveries were 71-99 % in the concentration range 0.048 -0.13 ng mL<sup>-1</sup>, with a relative standard deviation of 1.1-9.9%

Analytical sensitivity/detection limit and quantification limits for the whole method varied between 0.0078/ 0.0203/ 0.0676 ng mL<sup>-1</sup> for fluoranthene and 0.0006/ 0.0015/ 0.0051 ng mL<sup>-1</sup> for anthracene. A linear behavior for the extraction method was established with R<sup>2</sup> values between 0.9654 for fluoranthene and 0.9998 for anthracene.

The application of HLLC-HPLC-FLD to aqueous pristine samples from ice core sections allowed the detection and quantification in the order of pg mL<sup>-1</sup>, of most analytes (less coronene and BaA) in samples. Significant differences were found at different depths when the total PAHs under study were considered.

# 1. INTRODUCCIÓN

El estudio de los glaciares como indicadores de cambio climático se ha hecho cada vez más relevante; registros obtenidos desde testigos de hielo extraídos desde glaciares de la Cordillera de los Andes, Groenlandia y Antártica son cada vez más útiles para estudiar la composición química de la atmósfera pasada y sus cambios y por ende el clima del pasado. Estos archivos naturales cuentan la historia climática de la tierra desde hace varios cientos de miles de años, dependiendo del lugar de donde se extraigan y su profundidad. A través de los análisis químicos de estas muestras prístinas es posible obtener información única sobre fuentes, vías y distribución histórica de especies químicas en la atmósfera.

La obtención de testigos de hielo de lugares remotos representa un gran despliegue logístico y operacional y consecuentemente un alto costo. Estos son divididos en estratos representativos de los cuales se obtienen distintos tipos de muestras para ser sometidas a una serie de análisis físicos y químicos. Los sistemas de fusión de testigos de hielo continuos con muestreo discreto pueden generar volúmenes de muestra del orden de los ml, con resolución de hasta 1 cm de hielo por muestra. Cada muestra representa una determinada resolución temporal, que dependerá del lugar de muestreo. Respecto a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), aun cuando son compuestos ubicuos, se espera que su concentración en este tipo de muestras consideradas prístinas, sea del orden de los  $\text{ng L}^{-1}$ . Así, surge la necesidad de implementar y validar una metodología analítica que permita su determinación en muestras acuosas a dichas concentraciones disponiendo de volúmenes que alcanzan a tan solo unos pocos mililitros.

Los HAPs constituyen una familia de contaminantes orgánicos semi-volátiles hidrofóbicos, lipofílicos con baja solubilidad en agua, presentes tanto en la atmósfera, suelos y aguas. De acuerdo a sus características físicas, químicas y biológicas (tabla 1) pueden dividirse en 2 grupos, los de menores masas molares que son significativamente tóxicos, por ejemplo para microorganismos acuáticos (2-3 anillos: naftaleno, fluoreno, fenantreno y antraceno) y los de mayores masas molares (4 a 7 anillos: de criseno a coroneno), dentro de los cuales varios compuestos exhiben carácter genotóxico, mutagénico y carcinogénico [Lammel y col., 2009; Zhao y col., 2009].

**Tabla 1.** HAPs en estudio y sus principales características físicas, químicas y biológicas

HAP	<sup>A</sup> Masa molar [g mol <sup>-1</sup> ]	<sup>A</sup> Solubilidad en agua [µg L <sup>-1</sup> ] a 25°C	<sup>A</sup> log <i>K<sub>ow</sub></i>	<sup>A</sup> Presión de vapor [mm Hg] a 25°C	<sup>B</sup> Carcinógeno	<sup>A</sup> Estructura Química
Naftaleno	128,2	31700	3,37	8,5*10 <sup>-2</sup>	No	
Acenaftileno	152,2	16100	3,94	9,1*10 <sup>-4</sup>	No	
Acenafteno	154,2	3900	3,98	2,5*10 <sup>-3</sup>	No	
Fluoreno	166,2	1900	4,18	6,3*10 <sup>-4</sup>	No	
Fenantreno	178,2	1150	4,46	1,1*10 <sup>-4</sup>	No	
Antraceno	178,2	75	4,45	2,7*10 <sup>-6</sup>	No	
Fluoranteno	202,3	260	5,16	1,2*10 <sup>-8</sup>	No	
Pireno	202,3	1350	4,88	4,6*10 <sup>-6</sup>	No	
Benzo[a]antraceno	228,3	9,4	5,76	1,0*10 <sup>-7</sup>	Si	
Criseno	228,3	2,0	5,81	6,2*10 <sup>-9</sup>	No	
Benzo[b]fluoranteno	252,32	1,5	5,78	5,0*10 <sup>-7</sup>	Si	
Benzo[k]fluoranteno	252,32	0,8	6,11	2,0*10 <sup>-9</sup>	Si	
Benzo[a]pireno	252,32	1,6	6,13	5,5*10 <sup>-9</sup>	Si	
Dibenzo[a,h]antraceno	278,4	2,5	6,75	1,0*10 <sup>-10</sup>	Si	
Benzo[g,h,i]perileno	276,3	0,03	6,63	1,0*10 <sup>-10</sup>	No	
Indeno[1,2,3-cd]pireno	276,3	0,02	6,70	1,0*10 <sup>-10</sup>	Si	
Coroneno	300,40	0,01	6,90	1,5*10 <sup>-11</sup>	No	

<sup>A</sup> <[http://www.ccme.ca/assets/pdf/pah\\_soqg\\_scd\\_1445.pdf](http://www.ccme.ca/assets/pdf/pah_soqg_scd_1445.pdf)><sup>B</sup> <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69-c2.pdf>>

Estos contaminantes están presentes en concentraciones significativas en las áreas urbanas, sin embargo, han sido detectados en zonas remotas como Antártica y Groenlandia, lo que ilustra su amplia distribución ambiental y su carácter ubicuo [Masplet y col., 2000; Martins y col., 2010; Minero y col. 2010]. Generados principalmente por combustión incompleta tanto de biomasa como de combustibles fósiles; como consecuencia de su persistencia y capacidad de re-volatilizarse en el ambiente pueden viajar grandes distancias, siendo el transporte atmosférico de largo alcance una vía de llegada a las zonas polares [Wang y col., 2009]. En las altas latitudes y a bajas temperaturas los procesos de deposición son más importantes que los de evaporación.

Distintos tipos de combustión producen diferentes distribuciones de HAPs en el ambiente de acuerdo a su masa molar e isomería, es decir, cada fuente produce un patrón característico, así, estos compuestos pueden ser considerados como trazadores tanto de actividades antropogénicas como de ciertos eventos naturales. La presencia de dichos compuestos y su cronología en muestras de Antártica podría asociarse a los eventos antes mencionados [Kim y col., 2006; Valero-Navarro y col., 2007], destacando el posible origen de las fuentes tanto local como extra-continental de acuerdo a la circulación atmosférica y las propiedades fisicoquímicas de cada hidrocarburo.

Como es de esperar, el análisis de muestras de naturaleza prístina requiere de cuidadosos procesos de muestreo y pre-tratamiento para lograr una determinación analítica de los compuestos de interés con una elevada sensibilidad, los más bajos límites de detección y apropiada exactitud y precisión. Dentro de los métodos de extracción de HAPs desde soluciones acuosas se encuentra la extracción líquido-líquido y la extracción en fase sólida, metodologías tradicionalmente aplicadas, para las cuales se presentan resultados variables en cuanto a precisión y exactitud, pueden requerir grandes volúmenes de solventes, generando residuos y son difíciles de implementar para el análisis de un elevado número de muestras. En este contexto, en los últimos años se desarrollaron varias micro-técnicas [Bosch y Sánchez, 2009; Leong y col., 2010; Rezaee y col., 2010; Wu y col., 2008], tales como microextracción en fase sólida, microextracción líquido-líquido, extracción por punto de nube o *cloud-point*, microextracción en gota o *single drop* y microextracción dispersiva líquido-líquido, las cuales resultan más eficientes que las dos clásicas. Estas presentan, al igual que las anteriores, exactitud y precisión variable, límites de detección y cuantificación que no resultan apropiados para el análisis de muestras de testigo de hielo y además no todas sirven al propósito de determinar todos los HAPs

definidos como prioritarios. La aplicación de cada una de estas técnicas se verá también condicionada por la instrumentación disponible en cada laboratorio a lo que se suma la necesidad de implementarlas para pequeños volúmenes de muestra.

La extracción homogénea líquido-líquido, basada en la distribución de compuestos orgánicos mediante la formación de una fase sedimentada [Tavakoli y col., 2008], constituye un método de extracción y pre-concentración de compuestos orgánicos del tipo de los HAPs, simple y eficiente y permite trabajar con pequeños volúmenes de muestra, del orden de unos pocos mL. Dicha técnica cuenta con gran potencial de pre-concentración, característica deseable por las concentraciones de trabajo, reduce extraordinariamente los tiempos de extracción (menos de 10 minutos el proceso completo), tiene bajos costos de implementación y de almacenamiento y reduce el consumo de solventes y la exposición a los mismos, generando consecuentemente muy pocos residuos.

De este modo la primera parte y fundamental de esta investigación se ha centrado en el desarrollo y optimización de una completa metodología que permite la pre-concentración y cuantificación de los analitos a un nivel de concentración del orden de  $\text{ng mL}^{-1}$  en muestras acuosas, basada en Extracción Homogénea Líquido-Líquido (HLL) asociada a la determinación analítica por cromatografía líquida de alta resolución con detección por arreglo de diodos en primera instancia (HPLC-DAD) y una segunda etapa que permite acceder a niveles de concentración apropiados para el tipo de muestra estudiada, utilizando cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FLD). La sección final de este trabajo consistió en la determinación de HAPs mediante HLL-HPLC-FLD en muestras de un testigo de hielo de Antártica estableciéndose preliminarmente su distribución y posible origen. Estos constituyen antecedentes únicos respecto a presencia de HAPs en un tipo de muestra que permite establecer con una resolución temporal estacional las condiciones ambientales en estudios paleoclimáticos.

## **2. HIPÓTESIS**

Es posible detectar y cuantificar hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras acuosas prístinas a través de la técnica de extracción homogénea líquido-líquido y cromatografía líquida de alta eficiencia.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo General**

Desarrollar una metodología analítica para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en muestras acuosas prístinas.

### **3.2. Objetivos Específicos**

- i. Determinar concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con detección UV (HPLC-DAD) y detección por fluorescencia (HPLC-FLD) en muestras acuosas diluidas.
- ii. Diseñar y validar una metodología analítica de extracción y concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos que permita su determinación en muestras acuosas en concentraciones del orden de trazas y ultratrazas.
- iii. Cuantificar hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras acuosas prístinas, correspondientes a fracciones de un testigo de hielo de Antártica, para obtener un perfil preliminar de estos compuestos en dicho testigo.
- iv. Asociar exploratoriamente la presencia de los compuestos cuantificados a posibles fuentes utilizando antecedentes bibliográficos.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son una familia de más de 100 compuestos orgánicos; estas moléculas se caracterizan por ser hidrofóbicas y presentar en su estructura molecular, anillos aromáticos fusionados. Son incoloros, blancos o amarillo verdosos, liposolubles y algunos bastante volátiles. La mayoría no tiene utilidad conocida, sólo unos pocos como naftaleno y antraceno son utilizados en la manufactura de tinturas, explosivos, plásticos, lubricantes y repelentes de polillas; coroneno es utilizado como endurecedor (arena de moldeo). Se forman fundamentalmente en procesos de combustión incompleta de materiales orgánicos, tales como madera, carbón, petróleo, aceites combustibles y tabaco, por lo que están asociados directamente a actividades antropogénicas, encontrándose en el humo del cigarro, emisiones de automóviles, procesos industriales exhaustivos, emisiones de refinerías de petróleo, etc. [Yunker y col., 2002].

Su origen en la naturaleza está ligado a incendios forestales y a la actividad volcánica principalmente, sin embargo, se ha determinado que además son derivados de algunos procesos biológicos [Nabbefeld y col, 2010; Wilcke, 2007].

Las áreas urbanas son importantes fuentes de HAPs hacia la atmósfera, debido a la utilización de combustibles a nivel doméstico, la presencia de industrias y emisiones asociadas, la producción de energía y el transporte, entre otras actividades. De este modo, como la circulación atmosférica es una eficaz vía de transporte de especies contaminantes orgánicas, que posteriormente son depositadas por precipitación, los HAPs han sido detectados en áreas tan remotas como Groenlandia y Antártica, sugiriendo una amplia distribución en el mundo [Herber y col., 2006; Kim y col., 2006; Minero y col., 2010].

Estos compuestos se transportan en la atmósfera, tanto en el material particulado como en las fases acuosa y gaseosa, depositándose en diferentes ambientes naturales como suelos, sedimentos y agua por acción del viento y la lluvia. Su presencia en la fase acuosa se explica por la interacción del agua con otros compuestos solubles que se encuentran suspendidos, aportando

un aumento de la reactividad del sistema y de la superficie de reacción, que lleva al incremento de la solubilidad en esta fase [Bourdat-Deschamps y col., 2007; Prieto-Blanco y col., 2010].

Su presencia en ambientes acuáticos se debe esencialmente a derrames y fugas de combustibles fósiles, descargas de desechos industriales y domésticos, lluvia y percolación de residuos. En el agua son más persistentes que en el aire. De acuerdo a su forma de entrada al medio ambiente pueden ser clasificados como contaminantes puntuales (ejemplo: por derrame de petróleo) o no puntuales (ejemplo: por depositación atmosférica) y se incluyen entre los mayores contaminantes orgánicos dispersos. Aguas y sedimentos de áreas fuertemente industrializadas en general presentan concentraciones mayores que las encontradas en zonas remotas [Shamsipur y Hassan, 2010].

El transporte atmosférico de largo alcance es una de las vías de entrada de estos compuestos desde las zonas de generación a las regiones polares [Gouin y col., 2004]. En este sentido, sus características físico-químicas son fundamentales para entender su distribución en varios ambientes, por ejemplo, de acuerdo a las investigaciones de Wang y col. [2009], el coeficiente de partición gas/partícula ( $Kp$ ) de estos compuestos es un parámetro importante en dicho transporte, su depositación y transformación química en el medioambiente; de acuerdo a la ecuación 1 se establece la relación entre  $Kp$  y la presión de vapor de líquido sub-enfriado  $p_L^o$  ( $m$  y  $c$  son parámetros de regresión), encontrándose que, en general, HAPs de menor masa molar, con  $\log p_L^o > -2,0$  se encuentran principalmente en fase vapor y están sujetos a ser transportados a sitios remotos; los HAPs de mayor masa molar, con  $\log p_L^o < -4,0$ , se asocian a material particulado, depositándose de acuerdo a la disposición del mismo, usualmente cerca de las regiones de generación; los HAPs con masas molares intermedias, con valores de  $\log p_L^o$  entre  $-2$  y  $-4$ , pueden distribuirse tanto en el material particulado como en la fase gaseosa. Adicionalmente,  $\log K_{OW}$  ha sido utilizado para caracterizar la bioacumulación en la cadena alimenticia, pues de este parámetro dependerá en gran medida su biomagnificación [Lohmann y col., 2007; Wang y col, 2009].

$$\log Kp = m \log p_L^o + c$$

**Ecuación 1**

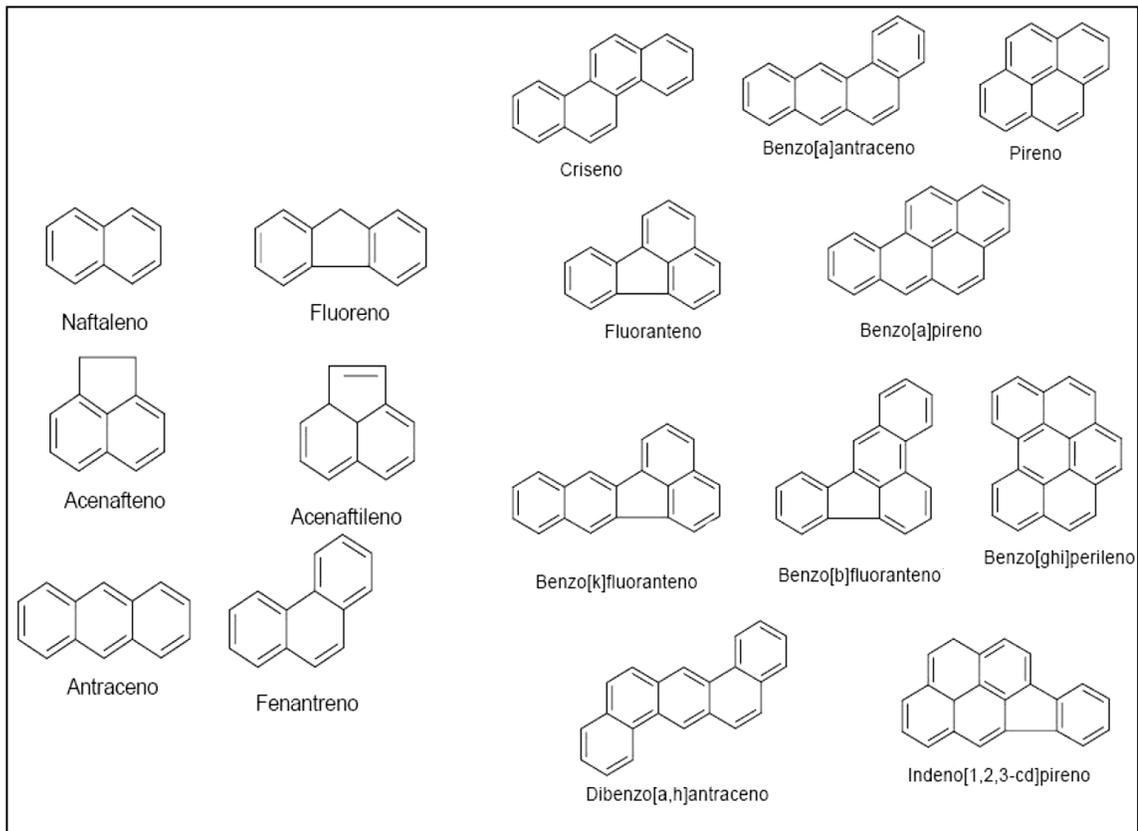
El interés por el estudio de estos compuestos en el medio ambiente radica en que son ubicuos y algunos de ellos altamente nocivos para la salud, exhibiendo carácter mutagénico, teratogénico y carcinogénico, el que se incrementa al ser bioacumulados a través de la cadena trófica. Estos compuestos pueden inducir estrés oxidativo a nivel celular y daño oxidativo en el ADN a través de la activación metabólica y generación de especies reactivas oxigenadas [Ma y col., 2010].

Los HAPs de 2 a 3 anillos son tóxicos, mientras que los de 4 a 7 anillos se consideran potencialmente peligrosos por ser mutagénicos y carcinogénicos. De acuerdo a dichas características la Unión Europea y la *US Environmental Protection Agency* (US EPA) han catalogado a 16 de estos compuestos como Contaminantes Prioritarios [Lammel y col., 2009; Zhao y col., 2009]. Las estructuras de estos compuestos se muestran en la figura 1.

El ser humano está expuesto a los HAPs principalmente por la ingesta de agua y alimentos contaminados, inhalación y contacto directo con la piel. El monitoreo de estos compuestos es contante y existen límites establecidos, por ejemplo para benzo[a]pireno, que es considerado potencial carcinogénico, la US EPA ha establecido como concentración máxima 200 ng L<sup>-1</sup> para agua potable, mientras que la *World Health Organization* (WHO) lo ha fijado en 700 ng L<sup>-1</sup>; la Unión Europea (directiva 98/83/EC) ha establecido regulaciones para fluoranteno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-c,d]pireno, considerando un máximo permisible de 10 ng L<sup>-1</sup> para benzo[a]pireno y 100 ng L<sup>-1</sup> para la suma de los otros HAPs nombrados anteriormente, estableciendo límites fuertemente restrictivos para estos compuestos en diferentes tipos de aguas superficiales [Cheng y col., 2011; Wah Lim y col., 2007].

Nuestra civilización depende fuertemente de la combustión, por lo que los HAPs están inevitablemente asociados a nuestras actividades, especialmente a la producción de energía. Estos compuestos se pueden considerar como trazadores tanto de actividades antropogénicas como de ciertos eventos naturales, considerando que su abundancia puede ser directamente proporcional a los procesos de combustión en la región y estar directamente relacionada con la calidad del aire. Callen y col. [2007] informaron la presencia de HAPs en material particulado PM10 (con diámetro aerodinámico menor o igual a 10 micrones) recolectado en Zaragoza (España), predominando coroneno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-c,d]pireno; el registro fue de un año,

observándose una tendencia a superar los valores sugeridos por la Directiva Europea ( $0,1 \text{ ng m}^{-3}$ ) durante la estación fría, que coincide con la utilización de calefacción y aumento de ciertas emisiones asociadas al consumo energético, encontrándose además una relación con los vientos asociados en cuanto a la distribución de los contaminantes.



**Figura 1** Estructuras químicas de HAPs declarados prioritarios por *US EPA* [[http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs69.html](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.html)]

De acuerdo a Wilcke [2007] hay evidencia de la generación biológica de algunos de estos compuestos, aunque no es tan significativa frente a otras ya mencionadas; por ejemplo, la producción de naftaleno ha sido derivada de su presencia en flores de Magnolia y del aroma de diferentes especies de *Annonaceae* en los bosques lluviosos del Amazonas; además dicho compuesto es producido por *Muscodor vitigenus*, un hongo endofítico de una liana de la región amazónica de Perú; también se ha detectado en nidos de termitas *Coptotermes formosanus* en Norteamérica subtropical, una especie proveniente de Asia del Este y en nidos de termitas de

varios géneros del Brasil tropical, lo que sugiere que la síntesis de naftaleno puede estar asociada a termitas o a micro-organismos. Fenantreno puede ser producido biológicamente a partir de precursores de alquilfenantreno en desechos de vegetales y perileno es producido en forma biológica en ambientes anaeróbicos de suelos y sedimentos.

Distintos tipos de combustión producen diferentes distribuciones de HAPs en el ambiente de acuerdo a su masa molar e isomería, es decir, cada fuente produce un patrón característico, donde su distribución estará gobernada por las propiedades químicas y físicas de los compuestos. Por ejemplo, en el caso de incendios de bosques boreales los indicadores químicos clásicos son el ión amonio, glicolatos y oxalatos y existe además un trazador-HAP particular, el retno, producto característico de la degradación térmica de un ácido orgánico propio de la resina de coníferas, el ácido abiético [Ramdahl, 1983; Masclat y col., 2000]. Masclat y col. [1995] encontraron en material particulado algunos HAPs característicos de incendios de bosques de la sabana de Lamto, Costa de Marfil, asociando coroneno, criseno y pireno a estos eventos.

Los suelos contaminados por derrames de petróleo se caracterizan por presentar HAPs de bajo peso molecular, tales como naftaleno y fenantreno [Ailabie y col., 1999].

Los HAPs de alto peso molecular (mayor o igual a 202) con 4-6 anillos aromáticos, como fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, benzo[e]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-c,d]pireno son frecuentemente asociados con procesos de combustión. Sin embargo, más que las concentraciones individuales de cada HAP resulta interesante las relaciones establecidas entre algunos de ellos para la identificación de la posible fuente y así poder determinar el origen del contaminante [Dvorská y col., 2011; Wang y col., 1999]. Una razón superior a 1 entre compuestos de bajo peso molecular con dos o tres anillos y compuestos de alto peso molecular con cuatro a seis anillos puede interpretarse como preponderancia de fuentes pirolíticas [Gonzalez-Piñuela, 2006]. La contaminación de origen petrogénico es caracterizada por razones fenantreno/antraceno superiores a 10 y fluoreno/pireno inferiores a 1; en contraste con lo que ocurre si el origen es pirogénico, donde la razón fenantreno/antraceno tiene valores menores a 10 y fluoreno/pireno mayores que 1, siendo

también asociada con este caso una razón antraceno/antraceno+fenantreno mayor a 0,10 [Stortini y col., 2009, Yunker y col., 2002].

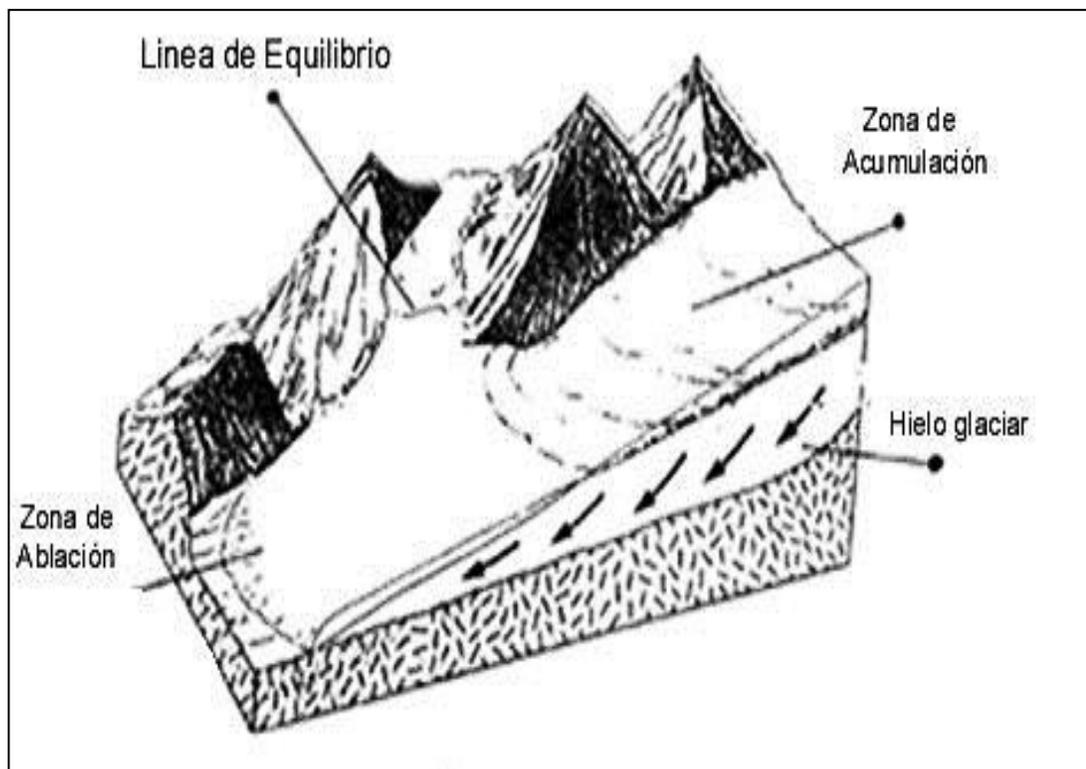
Benzo[a]antraceno/benzo[a]antraceno+criseno, fluoranteno/fluoranteno+pireno e indeno[1,2,3-c,d]pireno/indeno[1,2,3-c,d]pireno+ benzo[g,h,i]perileno corresponden a razones utilizadas para asignar posibles fuentes de los HAPs encontrados en las muestras en estudio. En el primer caso, si la razón benzo[a]antraceno/ benzo[a]antraceno+criseno es menor a 0,20 indica derrames de petróleo como fuente, si se encuentra entre 0,20 y 0,35 corresponde a derrames de petróleo y combustión, y si es mayor a 0,35 señala combustión. Si la razón fluoranteno/fluoranteno+pireno es menor a 0,40 indica predominio de derrames de petróleo, si está entre 0,40 y 0,50 indica combustión de petróleo, y si es superior a 0,50 se asocia a indica vertidos de aguas residuales y combustión de carbón, pastizales y madera. En el caso de indeno[1,2,3-c,d]pireno/ indeno[1,2,3-c,d]pireno+ benzo[g,h,i]perileno si es inferior a 0,20 corresponde a petróleo, entre 0,20 y 0,50 es por combustión de petróleo, y si es superior a 0,50 indica combustión de carbón, pastizales y madera [Martins y col., 2010; Yunker y col., 2002]. Adicionalmente, reteno/reteno+criseno es útil para diferenciar entre combustiones de petróleo/madera y de coníferas particularmente, implicando valores entre 0,15 y 0,50 para el primer caso y mayores que 0,80 para el segundo [Denis y col., 2012].

## **4.2. Glaciares y Acumulación de Contaminantes**

Descubrimientos recientes han demostrado que pueden ocurrir cambios climáticos importantes en la tierra en sólo unas pocas décadas [O'Brien y col., 1995]. La información sobre la variabilidad climática y química de la atmósfera en el pasado, permite realizar reconstrucciones paleoambientales y así generar modelos climáticos que predigan condiciones futuras [Fujita, 2008; Solomina, 2008].

Los glaciares son masas de hielo que se originan en la superficie terrestre por compactación y re-cristalización de la nieve, mostrando evidencias de flujo en épocas pasadas y/o en el presente. Estas masas de hielo y nieve se generan principalmente por la precipitación atmosférica sólida, en aquellas áreas de la tierra donde existen climas fríos, como las zonas polares y las montañas [Jansson y col., 2003]. Cuando las temperaturas se mantienen bajo el

punto de congelación, la nieve caída puede cambiar su estructura, principalmente por apisonamiento, o por sucesión de capas de nieve, ya que la evaporación y re-condensación del agua causa la re-cristalización para formar granos de hielo más pequeños, de forma esférica (neviza). Dentro del glaciar se puede diferenciar la zona de acumulación, que corresponde al sector donde no hay fusión ni pérdida de masa; la zona de ablación, donde se produce pérdida y la línea de equilibrio que separa ambas zonas (figura 2). Actualmente son ampliamente reconocidos como archivadores de las condiciones atmosféricas y ambientales del pasado [Bigler y col., 2010; Curran y col, 2001; Godoy y col., 2002; Ohno y col., 2005].



**Figura 2.** Elementos de un glaciar [<http://www.glaciologia.cl/>]

Al reconocer la contribución al aumento del nivel mar de los glaciares de montañas se genera interés por entender sus efectos [Meier, 1984; Braithwaite y col., 2002] y su asociación con cambios del clima a nivel mundial [Leiva y col., 2007; Sicart y col., 2007].

Se han realizado diversos estudios en glaciares de latitudes medias de ambos hemisferios, permitiendo tener actualmente un mayor conocimiento sobre la contribución a los ciclos atmosféricos de especies químicas con tiempos de vida del orden de días [Vincent y col.,

2005; Kang y col., 2009; Espizua y col., 2009], presentes en partículas de aerosoles atmosféricos. En los trabajos glaciológicos de Frolova y col. [2009] y de Xu y col. [2010] se estudió el efecto enfriador de los aerosoles atmosféricos sobre la atmósfera y su compensación al calentamiento por el efecto invernadero debido a las emisiones de gases de origen antrópico.

Investigaciones en muestras de hielo provenientes de los Andes Centrales han sido un gran aporte en el estudio de los fenómenos de La Niña y El Niño. Ginot y col. [2002] en un estudio realizado en el glaciar del Cerro Tapado, en el norte de Chile, establecieron claramente el papel de éste como registro paleoambiental y climático; la suposición de que este sitio era afectado fuertemente por los fenómenos de El Niño y La Niña fue el punto de partida de este trabajo, el cual arrojó importante información sobre la forma en que se dio este síndrome climático durante los últimos 100 años. Considerando para ello la concentración de especies químicas se detallaron los periodos de sequedad y humedad en la zona. El enriquecimiento en cloruros se asoció siempre a sublimación, proceso que predomina con La Niña y de acuerdo a las variaciones en las concentraciones de amonio y protones, se estableció que el fenómeno de acumulación estaba asociado a El Niño.

La selección del glaciar a estudiar es un aspecto importante a considerar en cuanto a la información que se desea obtener, para lo cual es fundamental tener en consideración los fenómenos que predominan en la zona, tales como ablación y percolación, y la tasa de acumulación de nieve [Singh y col., 2004; 2005].

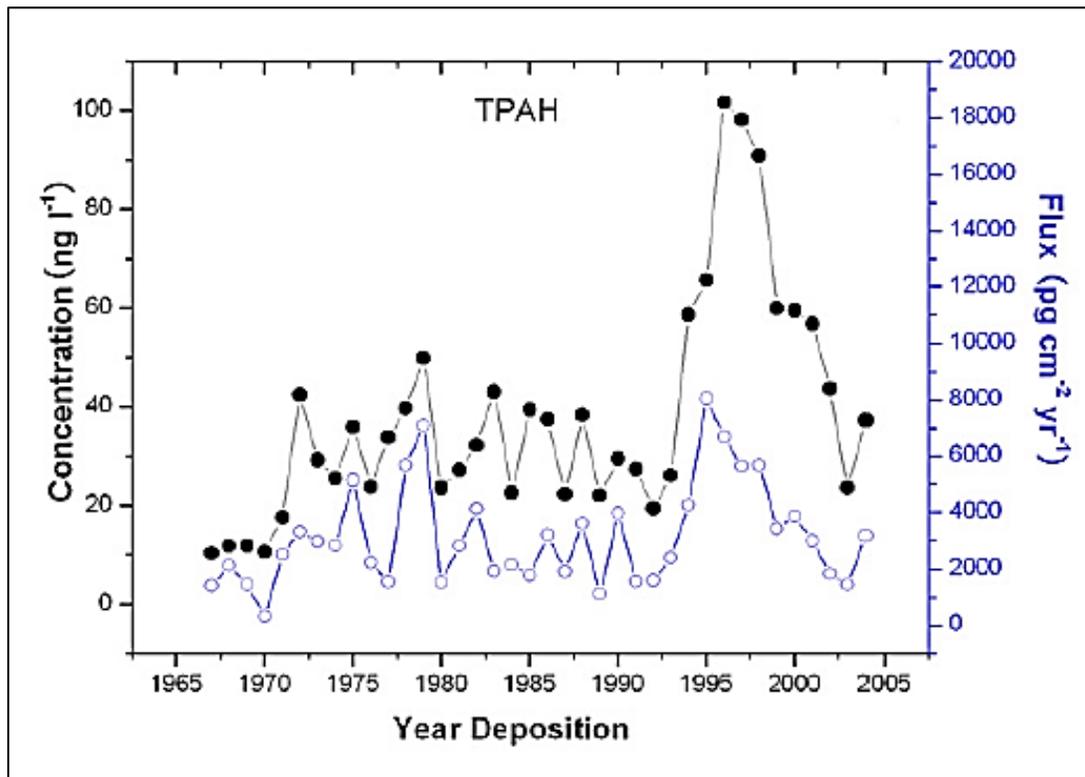
Los Testigos de Hielo corresponden a muestras de sección cilíndrica que se obtienen por perforación del manto de hielo a diferentes profundidades y que, por lo tanto, contienen la estructura en capas de nieve y hielo acumuladas durante intervalos de tiempo largos, representados por estratos de apariencia y composición diferentes. Los análisis químicos de estas muestras son fundamentales para estudiar el clima del pasado, la composición química de la atmósfera y sus cambios.

Testigos de hielo de altas montañas se han utilizado en estudios sobre distribución de contaminantes orgánicos regional e históricamente, encontrándose que la distribución en hielo de pesticidas organoclorados (OCPs), pesticidas organofosforados (OPP) y compuestos

aromáticos policíclicos es un registro sobre el uso histórico de este tipo de compuestos [Wang y col., 2008; Slater y col., 2002].

Estudios afines con este tema son las investigaciones de Donald y col. [1999] sobre un glaciar temperado de *Rocky Mountains* (Estados Unidos), determinando el máximo flujo de depositación de diclorodifeniltricloroetano (DDT) en los años 80's, al menos una década después de que éste se prohibiera en Norte América . Wang y col. [2008] estudiaron registros históricos de DDT, hexaclorociclohexanos (HCHs) y HAPs en un testigo de hielo recolectado en el glaciar *East Rongbuk* ( $28^{\circ}31N$ ,  $86^{\circ}96 E$ ,  $6518 m.a.s.n.m.$ ), en la cara norte del *Mt. Everest*, monte Everest, en los Himalayas centrales, considerando el papel de las altas montañas en la distribución y transporte de contaminantes orgánicos. Sus resultados arrojaron concentraciones máximas de DDT de  $2 \text{ ng L}^{-1}$  a mediados de los 70's, que corresponde a un *peak* de casos de malaria en la India y altas concentraciones de HCHs a inicios de dicha década. Además encontraron disminuciones para DDT y HCH a niveles casi indetectables en los años 90's, que coincide con la prohibición de su uso en India. Las concentraciones encontradas de HAPs totales (figura 3) se incrementan bruscamente después de 1990 y registran un *peak* de  $100 \text{ ng L}^{-1}$  al final de esta década, cuando India entró en una rápida industrialización. Los HAPs encontrados en el testigo de hielo tienen fuentes principalmente pirogénicas, provenientes de la combustión incompleta de carbón y la quema de biomasa.

En cuanto a pesticidas organoclorados (POCs) Gregor y col. [1996] estudiaron su distribución en un testigo de hielo de *Agassiz Ice Cap* (Ártico canadiense), obteniendo el flujo de su depositación media de un período de 30 años; mientras que el grupo de Villa y col. [2003] realizaron un registro similar en el glaciar *Lys* (Italia), en muestras que comprenden un período de 40 años. En la caracterización de 40 m de un testigo de hielo proveniente de *Austfonna*, Noruega, Hermanson y col. [2005] encontraron altas concentraciones de POCs en las muestras, siendo Aldrín y Dimetoato los presentes en mayores concentraciones.



**Figura 3.** Concentraciones de HAPs totales encontradas por año en glaciar, Monte Everest [Wang y col., 2008]

Hacia finales de los años 90's se intensificó el estudio de los glaciares como fuentes de contaminantes orgánicos, encontrándose que si bien estos compuestos están secuestrados en el hielo y nieve durante años, se liberan posteriormente al derretirse la sección que los almacenaba. Blais y col. [2001] demostraron que el derretimiento de glaciares en el parque *Banff*, Canadá, suministraba entre el 50 y 95% de plaguicidas organofosforados al sistema de corrientes de agua, demostrando que esta situación contribuye fuertemente a la presencia de contaminantes en el ecosistema.

Con el aumento de las temperaturas globales se ha visto que el proceso de retroceso de glaciares se ha acelerado, liberando al medioambiente los compuestos que se encontraban secuestrados en el hielo, siendo necesarias evaluaciones sobre su impacto en la biota, considerando además los procesos de bio-acumulación de algunos de estos compuestos a través de las cadenas alimenticias y transporte en la atmósfera, lo cual podría magnificar su presencia en lugares remotos y ambientes de montaña. Así, la investigación de los niveles de

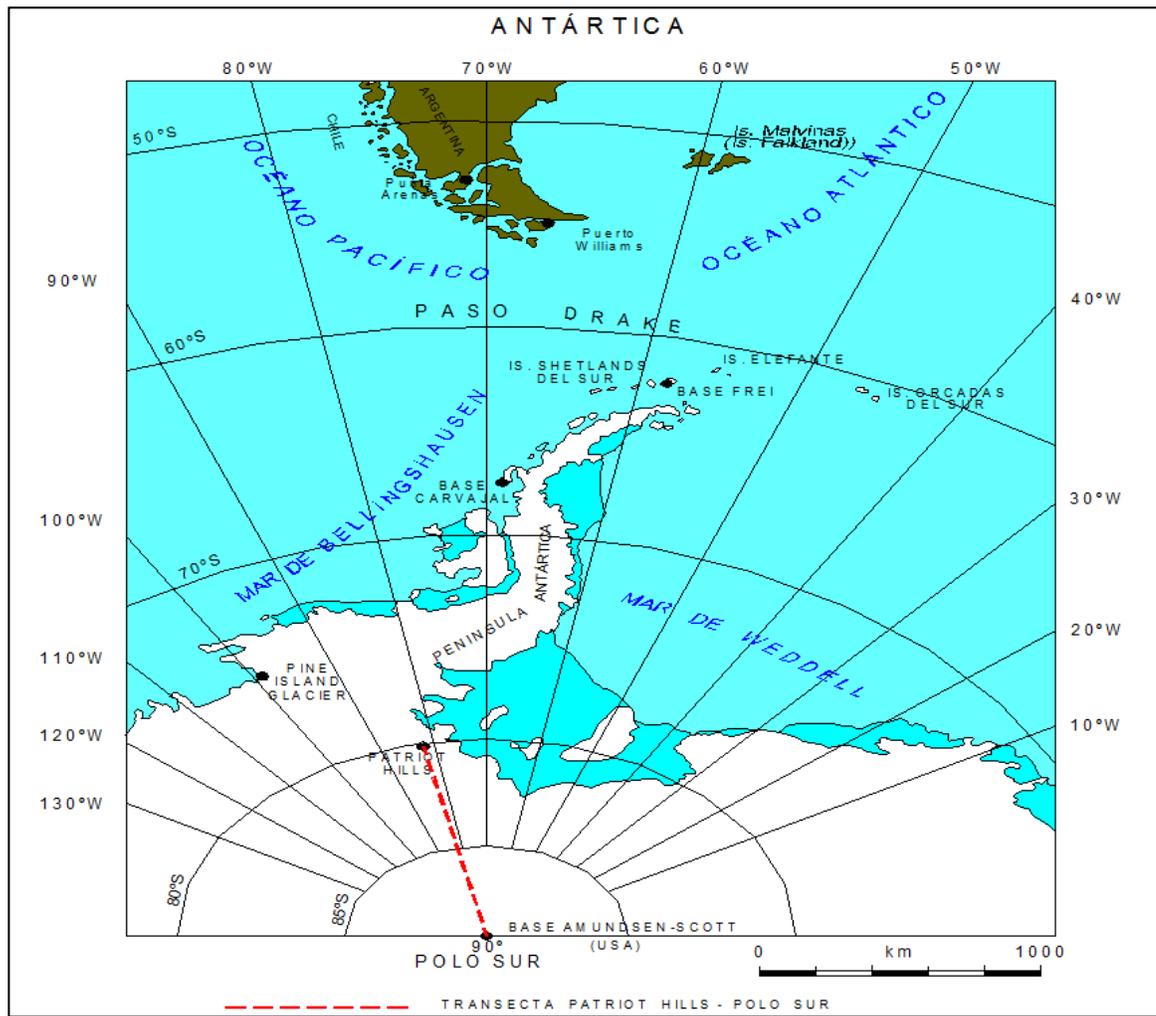
contaminantes orgánicos en testigos de hielo es fundamental para evaluar el potencial riesgo en la salud humana y animal.

### **4.3. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos y Antártica**

Antártica tiene un papel muy importante en la variabilidad y cambio climático, especialmente del hemisferio sur, donde las latitudes más altas corresponden a los sectores insular, peninsular y zona circundante o mar de hielo. La Antártica constituye una de las dos áreas fundamentales sobre la tierra donde hay pérdida neta de energía de la atmósfera hacia el espacio. Modelos de clima globales han sugerido que tanto el hemisferio austral como circulaciones globales atmosféricas son sensibles a cambios pequeños de la temperatura de la atmósfera antártica [Dixon, 2004]. Los datos aportados por la glacioquímica para este tipo de investigaciones, constituyen una forma de obtención de información única sobre fuentes, vías y distribución de especies químicas en la atmósfera en el tiempo [Fischer y col, 2007; Kazuho y col., 2008].

Registros de testigos de hielo de Antártica son claves para el estudio de cambios climáticos, por su ubicación geográfica y por estar en una zona ambientalmente limpia. Estos testigos al ser tomados a distintas profundidades y lugares distanciados geográficamente, son útiles para estudiar los diferentes períodos y la variabilidad espacial respectivamente [Kreutz y col., 2000; Meyerson y col., 2002; Gabrielli y col., 2005].

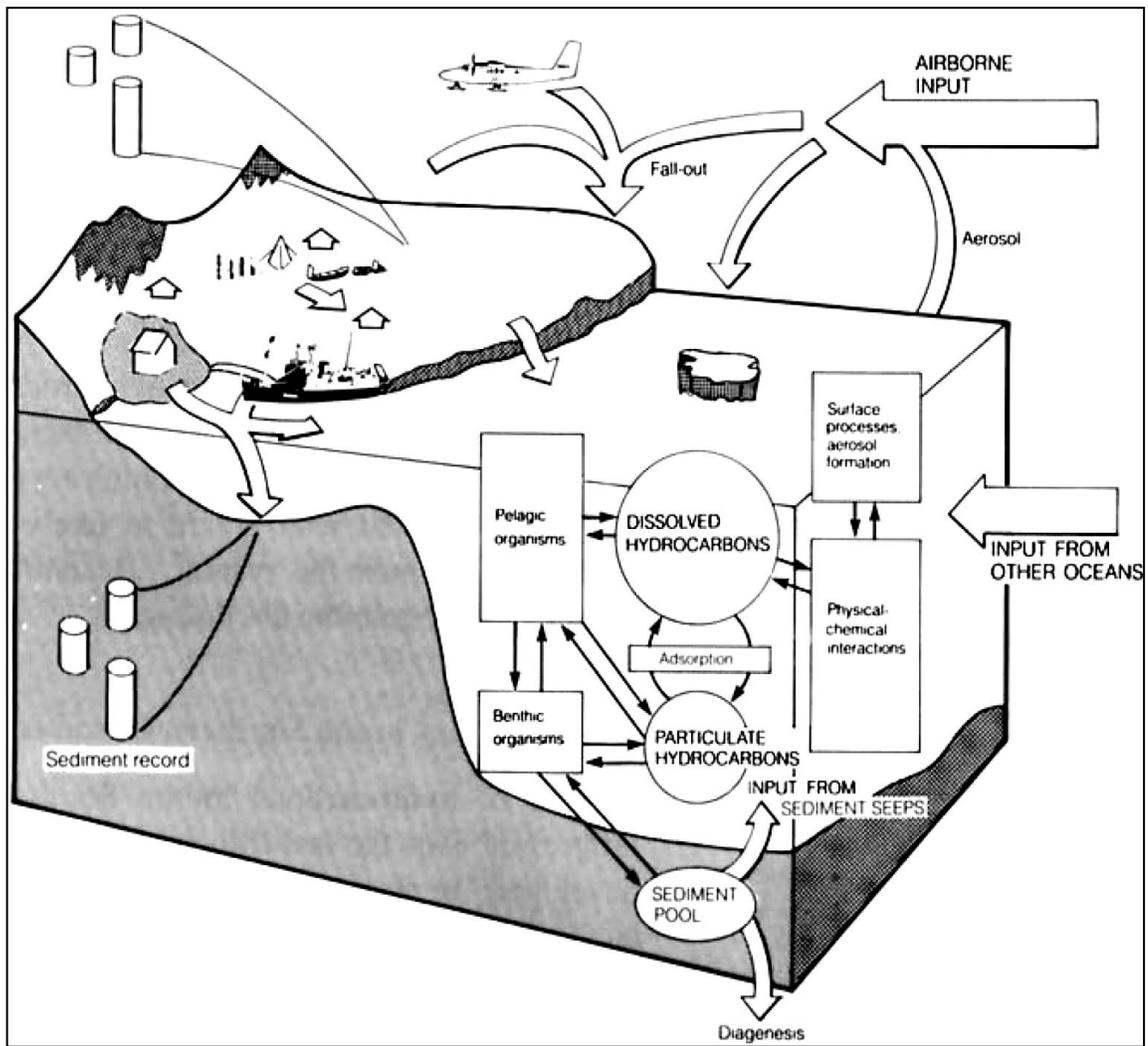
Dentro de los organismos internacionales que realizan investigación en la zona está la Expedición Científica Internacional Trans Antártica (ITASE), que agrupa a 20 países y fue creada en 1990 para describir y entender el cambio climático por determinaciones de variabilidad espacial y ambiental del clima antártico durante los últimos 200 años. [<http://www2.umaine.edu/itase/>]. Dicha agrupación realizó una expedición chileno-brasileña en el verano 2004/2005 (figura 4), con el fin de recolectar 6 testigos de hielo, de aproximadamente 46 m de longitud, desde la base chilena Teniente Parodi (80°18,2'S, 81°23,3'W) en *Patriot Hills* y el Polo Sur Geográfico (1.150 km) para estudios paleoclimáticos y contaminación en Antártica [Hammes y col., 2007].



**Figura 4.** Travesía terrestre desde *Patriot Hills* (80°S 81°W, 800 msnm) hasta el Polo Sur (2835 m snm).

Antártica se ha incluido generalmente entre las pocas regiones prístinas restantes del planeta, principalmente debido a su aislamiento de los grandes centros industriales, sin embargo, se ha informado la presencia de contaminantes orgánicos como hidrocarburos aromáticos policíclicos en diversos tipos de muestras de este continente y zonas aledañas. La presencia de estos compuestos puede deberse tanto al transporte desde los continentes como de las actividades desarrolladas *in situ*. La creciente actividad humana, operación de estaciones científicas, logística asociada, operación de barcos, pesca, turismo y derrames accidentales de combustibles han contribuido en cierto grado a la presencia de hidrocarburos en el ambiente antártico, especialmente a escala local. A ello se suma la posible contribución de las corrientes marinas, el transporte atmosférico y la depositación en el mar abierto como fuentes difusas (Ver

figura 5) [Cripps y Shears, 1997; Bargagli, 2008; Minero y col., 2010]. Si bien los HAPs están presentes en el ambiente natural principalmente por la combustión de madera, son las actividades humanas las que condujeron al aumento de los niveles de estos agentes contaminantes en todo el mundo.



**Figura 5.** Flujo de HAPs en ambiente marino antártico [Cripps y Priddle, 1991].

Las principales actividades humanas en esta región son investigación, turismo y pesca, todas estas actividades requieren combustibles para el transporte y la generación de energía. El crecimiento del turismo en los últimos 50 años, que incluye actividad naval y aeronáutica ha tenido un impacto en la zona [Ligget y col., 2011], tanto por derrames y fugas como por la generación de residuos. En 1991, Cripps y Priddle, ya habían advertido que las regiones marinas

y las zonas desprovistas de hielo en Antártica son particularmente vulnerables a la contaminación por hidrocarburos de petróleo. Los derrames accidentales del combustible en tierra ocurren principalmente cerca de las estaciones científicas donde el almacenaje y el reaprovisionamiento de combustible pueden dar lugar a vuelcos y fugas, los cuales muchas veces alcanzan a los sedimentos marinos [Curtosi y col., 2007; Kim y col., 2006; Préndez y col, 2011].

Cincinelli y col. [2005] encontraron concentraciones de HAPs entre 0,66 y 4,42 ng L<sup>-1</sup> en muestras de agua de mar superficiales recolectadas en la zona costera de la bahía de Terra Nova. Adicionalmente, Fuoco y col. [2005] informaron concentraciones de HAPs en el intervalo de 2000 a 3000 pg L<sup>-1</sup> para la capa superficial y entre 48 y 325 pg L<sup>-1</sup> a los 20 cm de profundidad de la columna de agua en *Gerlache Inlet* (Terra Nova); en este mismo sector en 2009, Stortini y col. [2009] detectaron HAPs en la capa superficial del mar, la cual es la zona de contacto entre la atmósfera y el océano (espesor típico de 40 a 100 µm), con valores entre 7,32 y 23,94 ng L<sup>-1</sup>; además informan concentraciones entre 5,27 y 9,43 ng L<sup>-1</sup> para muestras recolectadas a 0,5 m de profundidad. Dicho estudio incluyó la evaluación de posibles fuentes de acuerdo a los resultados obtenidos, encontrándose que la contribución fundamental es petrogénica, atribuyéndose a aportes locales como pequeños derrames y fugas, pero discutiéndose la dificultad para descartar aportes debidos al transporte atmosférico de largo alcance, ya que los hidrocarburos aromáticos policíclicos son altamente resistentes a la degradación y por lo tanto es posible que sean transportados a grandes distancias sin sufrir cambios en su estructura química [Lammel y col., 2009]. Determinaciones de este tipo de compuestos en muestras de columnas de agua del mar de Ross entregaron concentraciones entre 1,21 y 3,96 ng L<sup>-1</sup> en fase disuelta y entre 1,53 y 8,17 ng L<sup>-1</sup> en extractos de material particulado [Cincinelli y col., 2008].

Los sedimentos pueden constituir depósitos considerables de HAPs, en consecuencia, Martins y col. [2010] obtuvieron la distribución de HAPs en sedimentos de *Admiralty Bay*, isla Rey Jorge, de gran interés si se considera el incremento histórico de materiales de origen antropogénico a nivel local, correspondiente a los últimos 30 años, relacionando los compuestos encontrados tanto con la presencia humana en la zona como con el posible transporte atmosférico de largo alcance desde Sudamérica. La concentración máxima encontrada de HAPs derivados de combustión fue de 454,9 ng g<sub>peso seco</sub><sup>-1</sup> en una muestra extraída en los alrededores de la base brasileña Comandante Ferraz, datada entre 1995/1997. Alrededor del 78% de las muestras presentaron concentraciones inferiores a 30,0 ng g<sub>peso seco</sub><sup>-1</sup> y los compuestos fueron asociados a

petróleo, combustión de biomasa y aguas residuales. Préndez y col. [2011] cuantificaron alcanos y HAPs en muestras de sedimentos costeros de la península Fildes, un área desprovista de hielo en la isla Rey Jorge; encontraron HAPs en concentraciones bajo los  $14,4 \text{ ng } g_{\text{peso seco}}^{-1}$  en muestras tomadas durante el verano de 2005 y bajo los  $88,7 \text{ ng } g_{\text{peso seco}}^{-1}$  en muestras tomadas durante el verano de 2007. Establecen que la presencia tanto de HAPs como de alcanos es debida a la contribución de fuentes naturales y antropogénicas. Los resultados obtenidos muestran que existe un bajo aporte de contaminación antropogénica, destacando la utilización de combustible de la base china, no obstante, advierten que considerando la baja degradación de los hidrocarburos y su entrada continua a la atmósfera y ambiente marino pueden ser una amenaza a futuro, por los aportes biológicos y bioacumulación, por lo que sugieren estudios adicionales.

Curtosi y col. [2007] analizaron muestras de suelos superficiales, sub-superficiales (a una profundidad de 25 y 75 cm) y sedimentos marinos superficiales en las inmediaciones de la base Jubany, caleta Potter, encontrando niveles de HAPs comprendidos entre  $8,9\text{--}1239 \text{ ng } g_{\text{peso seco}}^{-1}$ , obteniendo las más altas concentraciones en las muestras de suelos a 75 cm de profundidad, posiblemente debido a la migración de los HAPs más solubles asociados a partículas finas y su posterior acumulación sobre el *permafrost*; los HAPs predominantes detectados fueron fenantreno, fluoreno, metilnaftaleno, naftaleno y antraceno. Concluyen que el patrón puede ser atribuido a una contaminación crónica originada por pequeños pero frecuentes derrames y pérdidas de combustible, a los gases de combustión de vehículos, generadores de energía eléctrica y quema de basura a cielo abierto (práctica habitual en la región hasta la implementación del Protocolo de Madrid). Advierten que la toma de muestras a nivel de superficie no refleja fehacientemente la concentración de estos contaminantes ya que la mayor concentración se encontró a niveles profundos, lo que sugiere acumulación sobre la cubierta de hielo permanente, situación a considerar en planificación de construcciones, en donde se realizan remociones y excavaciones de suelos, ya que los contaminantes podrían ser movilizados y transportados hasta la zona costera y marina. Los valores máximos de HAPs totales determinados en dicho estudio fueron menores a los reportados por Aislabe y col. [1999] en suelos contaminados por combustible (hace más de 30 años atrás) en las inmediaciones de la base Scott de Nueva Zelanda, con valores entre 41 y  $8105 \text{ ng } g_{\text{peso seco}}^{-1}$  siendo predominantes el naftaleno y sus metil derivados.

Así, la frecuente detección de HAPs en diferentes matrices medioambientales, que reflejan como fuentes de origen las actividades desarrolladas en el propio continente Antártico como aquellas desarrolladas fuera del mismo, además de las fuentes naturales permiten plantear su probable presencia en los distintos estratos representados en los testigos de hielo de áreas remotas, especialmente si se considera la creciente actividad industrial a nivel mundial.

#### **4.4. Determinación Analítica de HAPs en Muestras Acuosas**

La metodología analítica a utilizar dependerá del estudio que se quiera realizar, variará de acuerdo a la procedencia de las muestras y la matriz, siendo significativa la información disponible en bibliografía y la experiencia de laboratorio propiamente tal. Por ejemplo, en un trabajo de HAPs en muestras de agua del mar de *Ross* se incluyen etapas de filtración de las muestras, extracciones en baño ultrasónico y con solventes (hexano-cloruro de metileno) y determinación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, informándose concentraciones entre 1,21 y 3,96 ng L<sup>-1</sup> en la fase disuelta y entre 1,53 a 8,17 ng L<sup>-1</sup> en el extracto del material particulado [Cincinelli y col., 2008]. En otros casos para extracción de HAPs desde muestras de hielo, nieve y en agua, se utilizaron técnicas de extracción y microextracción en fase sólida, en fase líquida, extracción con fluidos súper críticos, con solventes, etc. [Doong y Chang, 2000; von Schneidemesser y col., 2008; Wang. y col., 2008A; Zhoua y Maskauib, 2003] Para su determinación en diversos tipos de muestras, posterior a la extracción, se utiliza fundamentalmente cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y cromatografía gaseosa (GC) con diversos detectores [Miege y col., 2003; Zhang y col., 2010].

De acuerdo a los antecedentes presentados para estos analitos se esperan niveles del orden de ultra trazas en muestras de agua/hielo provenientes de lugares remotos como Antártica, por lo cual es fundamental desarrollar procedimientos eficientes de pre-concentración y técnicas de separación y análisis altamente selectivas y sensibles. Además, si las muestras corresponden a testigos de hielo donde la resolución temporal depende de la factibilidad de obtener muestras de cada estrato para el análisis correspondiente, entonces el volumen de muestra será de solo unos cuantos mililitros. De acuerdo a las investigaciones mencionadas anteriormente los análisis de muestras de agua de mar y nieve requieren de grandes volúmenes de las mismas, de 500 mL hasta varios litros [Cincinelli y col., 2007; Masclet y col., 2000; Stortini y col., 2009], lo que implica

que las técnicas utilizadas no sean las más adecuadas planteándose como desafío analítico el desarrollar metodologías que permitan trabajar tanto con pequeños volúmenes de muestra como con concentraciones del orden de las ultra trazas.

En general, los métodos analíticos para determinaciones de HAPs incluyen HPLC con detección de fluorescencia (FLD) o con detección ultravioleta utilizando el detector de arreglo de diodos (UV-DAD), GC acoplada a espectrometría de masas (MS) con detección de ionización por llama (FID) y HPLC acoplada a espectrometría de masas con ionización por *electrospray* (ESI-MS) [Cheng y col., 2011; Ma y col., 2010; Okuda y col., 2006; Shamsipur y Hassan, 2010; Windal y col., 2008].

Previo al análisis químico instrumental es necesaria una etapa de preparación de la muestra, que incluya la extracción, limpieza y pre-concentración del o los analitos de interés, compatible con el sistema analítico a utilizar. Al analizar muestras donde los analitos se encuentran en muy baja concentración estos pasos cobran especial relevancia. Los métodos de extracción, pre-concentración y limpieza difieren según la matriz.

El método de extracción puede variar de acuerdo al grado de selectividad, rapidez y conveniencia. Dentro de los métodos tradicionales de extracción de este tipo de analitos se encuentra la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE) [Brum y col., 2008; Wolska, 2008]. La LLE se basa en la transferencia del analito desde una muestra acuosa a un solvente inmiscible con el agua; es ampliamente utilizada. Si bien el método estándar recomendado por la Organización Internacional para Estandarización (ISO) para determinar HAPs en agua, ISO 17993:2002, está basado en LLE y HPLC [Wolska, 2008], la LLE presenta algunos inconvenientes como emulsificación, uso de grandes volúmenes de solventes orgánicos, con la consecuente generación de desechos, y alto costo y poco amigable con el medio ambiente, además de resultar laboriosa y consumir bastante tiempo. La SPE utiliza menores cantidades de solventes que LLE, pero siguen siendo significativas y aunque puede ser automatizada, implica costos adicionales, además puede haber pérdida de los analitos por retención irreversible de los compuestos en las columnas de extracción [Kruger y col., 2011; Wu y col., 2008; Zgola-Grzeskowiak y Grzeskowiak, 2011].

En los últimos años se han desarrollado técnicas miniaturizadas con el objeto de reducir costos, residuos generados y tiempo por muestra. Dentro de estas técnicas está la microextracción en fase sólida (SPME). En SPME, los analitos de interés se extraen en una fibra polimérica, sólida, lo que ocurre por difusión pasiva de acuerdo al coeficiente de partición de la muestra a extraer. Es un método simple y relativamente rápido, pudiéndose automatizar [Sarafray y Amiri, 2010]; sin embargo, el costo de las fibras recubiertas generalmente es alto, y para algunas aplicaciones tienen vidas útiles limitadas [Zhao y col., 2009]. Otra micro-técnica de última generación es la microextracción líquido-líquido (LPME), que utiliza volúmenes de solventes del orden de los microlitros para lograr extraer los analitos desde la muestra acuosa, permitiendo obtener grandes factores de enriquecimiento, es económica y simple y utiliza pequeños volúmenes de solventes, generando sólo pequeñas cantidades de residuos [Pena-Pereira y col., 2012]; sin embargo, no está exenta de problemas tales como contaminación cruzada y otros comunes con LLE.

Dentro de las investigaciones recientes focalizadas en desarrollo de técnicas eficientes, económicas y más simples de implementar están la extracción por punto de nube o *cloud-point* (CPE), microextracción en gota o *single drop* (SDME), la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLE) y la extracción homogénea líquido-líquido (HLLE) [Bosch y Sánchez, 2009; Herrera-Herrera 2010]. En CPE la extracción está basada en la separación de fases, que ocurre entre la solución acuosa y un surfactante no iónico, cuando se somete el sistema a una temperatura dada (temperatura de *cloud-point*, o punto de nube). Sin embargo, dependiendo del surfactante seleccionado, puede ocurrir que hayan inconvenientes en el posterior análisis cromatográfico (GC o HPLC); por otro lado el sistema necesita un control y ajuste del pH durante el proceso, dependiendo del surfactante a utilizar [Zhao y col., 2009].

La SDME se desarrolló para reducir al mínimo el volumen de solvente utilizado en el pre-tratamiento de la muestra, además su costo es bajo y es rápida, además es útil para analitos volátiles y semi-volátiles y el efecto de la matriz puede ser evitado de acuerdo a la aplicación de la modalidad *head space* [Bosch y Sánchez, 2009; Wu y col., 2008] para la determinación por cromatografía de gases; sin embargo, tiene algunas desventajas tales como ruptura de la gota orgánica por agitaciones rápidas, formación de burbujas de aire y en algunos casos el equilibrio es alcanzado sólo en tiempos largos [Leong y Hang, 2008]. Otro método desarrollado recientemente es la microextracción en fibra hueca (HF-LPME), estabiliza mejor el sistema que

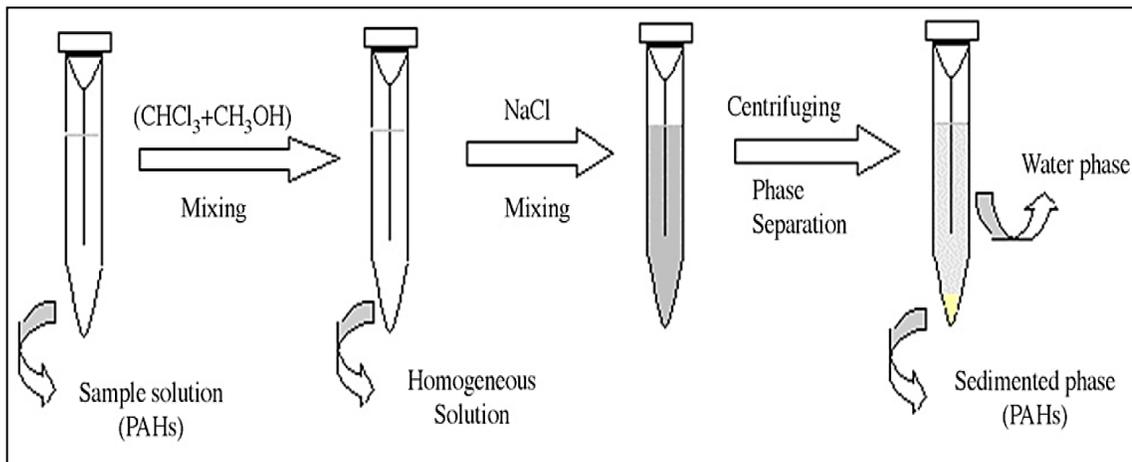
la SDME, permitiendo extracción y pre-concentración de los analitos desde matrices complejas de forma sencilla y con bajo costo, sin presentar problemas al agitar para acelerar la cinética de la extracción, permitiendo adicionalmente obtener extractos muy limpios, no obstante puede haber formación de burbujas en la superficie de la fibra y consume más tiempo que micro-técnicas de extracción recientes como DLLE y HLLE [Leong y col., 2010].

La DLLE fue introducida por Rezaee y col. en 2006. Es rápida y sencilla, constituida por un sistema ternario donde la selección del solvente extractante es esencial, siendo utilizados para estos fines cloroformo, disulfuro de carbono, tetracloroetileno y clorobenceno, dispersados en metanol, acetonitrilo u otro solvente miscible con agua. Esta técnica incluye la rápida incorporación de una mezcla de solventes (extractante y dispersante) en la muestra acuosa, produciéndose la formación de pequeñas gotas dispersadas en la muestra, obteniéndose por centrifugación una pequeña fase sedimentada con los analitos de interés concentrados [Bosch y Sánchez, 2009; Herrera-Herrera 2010; Zgola-Grzeskowiak y Grzeskowiak, 2011]. En el caso de HAPs en muestras de agua se ha utilizado DLLE con GC-FID en la detección, tetracloroetileno como solvente de extracción y acetona como solvente dispersante, obteniéndose volúmenes de fase sedimentada de 5  $\mu\text{L}$ , factores de concentración de hasta 1113 y límites de detección entre 0,007 y 0,030  $\mu\text{g mL}^{-1}$  [Rezaee y col., 2006]. Si bien los factores de enriquecimiento son altos la obtención de volúmenes muy pequeños de fase sedimentada puede constituirse en un factor que afecte el carácter cuantitativo del método, debido a las dificultades para separar éstos desde el fondo del vial. Por otra parte la técnica resulta apropiada para GC, sin embargo si los análisis se llevan a cabo por HPLC, será necesario realizar una posterior dilución para inyectar un volumen adecuado en el sistema.

En este contexto, la extracción homogénea líquido-líquido, también basada en el fenómeno de separación de fases [Rezaee y col., 2010], constituye un promisorio método de extracción y pre-concentración, simple y efectivo, con ventajas comparativas respecto a los tradicionales: gran potencial de pre-concentración, reduce extraordinariamente los tiempos de extracción, costos de implementación y de almacenamiento, consumo y exposición a solventes. Además permite trabajar con pequeños volúmenes de muestra, del orden de unos pocos mL. Y genera volúmenes de extracto apropiados para su uso en HPLC.

En este método los analitos se extraen por adición sobre la muestra acuosa de una solución que contiene al solvente extractante solvatado por el denominado solvente de consoluto, formando una solución homogénea; posteriormente se obtiene una fase sedimentada muy pequeña inducida por la modificación de la fuerza iónica en un sistema ternario, por adición de una sal. El procedimiento es sencillo, sólo requiere la adición de los reactivos y agitación manual y como no hay interfases entre agua y solvente extractante, el área en contacto es muy grande de forma rápida (unos pocos segundos) [Shamsipur y Hassan, 2010; Rezaee y col., 2006; Wang y col., 2008A].

En 2008, Tavakoli y col. realizaron la optimización univariada de esta metodología asociada a GC-FID para el análisis de HAPs en muestras de agua (figura 6), aplicando la metodología en muestras de agua de distintas procedencias (río, lluvia, desechos, termales, residuales)-. Las características deseables del solvente extractante son extraer de buena forma los analitos, separarse de las señales de los analitos en el cromatograma y tener mayor densidad que el agua; para la investigación de Tavakoli y col. [2008] se seleccionó con estos fines cloroformo. Además, es requisito que el solvente de consoluto sea miscible con el solvente extractante y la fase acuosa simultáneamente, considerándose en el estudio acetonitrilo y metanol, este último fue seleccionado de acuerdo a resultados en pruebas de recuperación. En general, tal como se realizó en el estudio descrito anteriormente, las metodologías analíticas son optimizadas seleccionando condiciones de partida, que una a una van siendo variadas y optimizadas [Cheng y col., 2011; Ma y col., 2010; Pena-Pereira y col., 2012; Wang y col., 2008A]. Sin embargo, en otros trabajos como el de Brum y col. [2008] y Bourdat-Deschamps [2007] para el desarrollo de metodologías de extracción y análisis de HAPs en agua han utilizado herramientas quimiométricas donde se estudian los factores significativos y sus interacciones en forma multivariada. Para ello es necesario el uso de adecuados diseños experimentales y el análisis e interpretación de resultados mediante ANOVA.



**Figura 6.** Esquema del proceso de HLLC utilizado por Tavakoli y col. [2008].

El Diseño Experimental permite evaluar estadísticamente un gran número de factores que podrían tener efecto sobre una respuesta de interés y la importancia de sus interacciones en ella, en base a la información disponible en literatura y/o experimentos exploratorios realizados, a través de un reducido número de experimentos. Los factores que resultan significativos en una determinada respuesta evaluada pueden ser optimizados simultáneamente de acuerdo a diversos modelos matemáticos [Bourdat-Deschamps, 2007]. Las optimizaciones multivariadas son consideradas más eficientes que los procesos univariados, ya que se basa en la realización de un grupo de experimentos estratégicos determinados en una matriz que incluyen combinaciones de los factores en los intervalos que se decida estudiar.

En la Metodología de Superficie de Respuesta, los factores que resultan ser importantes son llevados a los niveles óptimos para obtener la mejor respuesta. A través de un ajuste matemático del dominio experimental estudiado en el diseño teórico para la función respuesta, se obtienen las condiciones buscadas y la superficie gráfica de lo que ocurre en torno a ella. Se utilizan diseños de segundo orden como Compuesto Central, *Box-Behnken* y matriz *Doehlert* para determinar la función real que establece, entre otras cosas, el valor de la respuesta analítica y los factores seleccionados para la evaluación experimental. La gran ventaja observada en la aplicación de estos diseños es el pequeño número de experimentos que se requiere para construir el modelo de acuerdo a la ecuación 2:

$$N = k^2 + k + C_0$$

**Ecuación 2**

Donde  $N$  es el número de experimentos  $k$  es el número de variables en estudio y  $C_0$  es número de puntos centrales. [Stalikas y col., 2009]

De acuerdo a los antecedentes bibliográficos presentados se abordó en esta tesis el estudio e implementación de la técnica de extracción HPLE mediante análisis multivariado teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

- 1) La optimización del sistema para aplicar la metodología utilizando pequeños volúmenes de muestra y la obtención de volúmenes de extracto apropiados para ser utilizados en HPLC.
- 2) La posibilidad de la determinación simultánea de al menos los 16 HAPs señalados como prioritarios con una adecuada exactitud y precisión al nivel de ultratrazas.
- 3) La obtención de límites de detección y cuantificación apropiados a los niveles de concentración factibles de encontrar en las muestras de testigos de hielo.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Materiales

#### 5.1.1. Materiales y Reactivos

- Viales de vidrio Supelco 5 mL, troncocónicos, con tapa atornillada con teflón.
- Viales para HPLC con insertos de vidrio de 150  $\mu\text{L}$  y tapa plástica.
- Jeringa punta roma Hamilton Gastight 100  $\mu\text{L}$ .
- Espátulas metálicas.
- Material de vidrio volumétrico y de uso general clase A.

El material de vidrio fue tratado con 5% DMCS para desactivar la superficie en contacto con los compuestos de interés y evitar su adsorción.

- Agua calidad nanogrado.
- Metanol grado HPLC, Merck.
- Acetonitrilo grado HPLC, Fisher Scientific.
- Cloroformo grado cromatografía, Merck.
- NaCl, Merck.
- Naftaleno, fenantreno, antraceno, acenaftileno, fluoreno, fluoranteno, benzo[k]fluoranteno (BkF), benzo[b]fluoranteno (Bbf), benzo[a]pireno (BaP): AccuStandar. Acenafteno, benzo[g,h,i]perileno (BghiP), criseno, pireno: SIGMA. Dibenzo[a,h]antraceno (DahA), indeno[1,2,3-cd]pireno (I123cdP), benzo[a]antraceno (BaA), coroneno: Dr. Ehrenstorfer.
- Tolueno para cromatografía, Merck.
- 5% DMDCS dimetildiclorosilano en tolueno, Sylon-CT<sup>TM</sup>, SIGMA.
- Solución estándar: 1 mg de cada HAP en acetonitrilo, para obtener soluciones de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de cada compuesto.
- Solución Multiestándar 1(ME1): preparada a partir de las soluciones estándares de cada HAP en acetonitrilo. La concentración fue de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Renovada semanalmente.

- Solución Multiestándar 2(ME2): preparada a partir de las soluciones estándares de cada HAP en mezcla cloroformo: acetonitrilo 1:1. La concentración fue de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Renovada a diario.
- Soluciones acuosas preparadas a partir de ME1 en agua nanogrado diariamente previo a extracción.
- Curvas de calibración preparadas a partir de solución ME1 o ME2 por dilución en mezcla cloroformo: acetonitrilo (1:1) diariamente previo a medición.

### 5.1.2. Instrumentos y Equipos

- Balanza Analítica 40SM-200 AS Precisa.
- Balanza 4000C Precisa.
- Equipo purificador de agua NANOpure Ultrapure Water System Barnstead.
- Centrífuga Function Line HERAEUS Instruments 4000 rpm.
- Estufas de secado WTE Binder.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC) Waters con bomba cuaternaria W600 Waters.
- Detector de arreglo de diodos (DAD) Waters 996.
- Detector de fluorescencia (FLD) Waters 2475.
- Inyector automático Waters 717 Plus.
- Precolumna Phenomenex C18 (ODS, Octadecyl) 4mm L x 3.0mm ID.
- Columna para cromatografía líquida en fase reversa EnviroSep-PP, 125mm L x 4,6mm ID, tamaño de partícula  $3 \mu\text{m}$  (COLUMNNA 1)
- Columna para cromatografía líquida en fase reversa Inertsil ODS-P, 250 mm L x 4,6mm ID, tamaño de partícula  $5 \mu\text{m}$  (COLUMNNA 2)

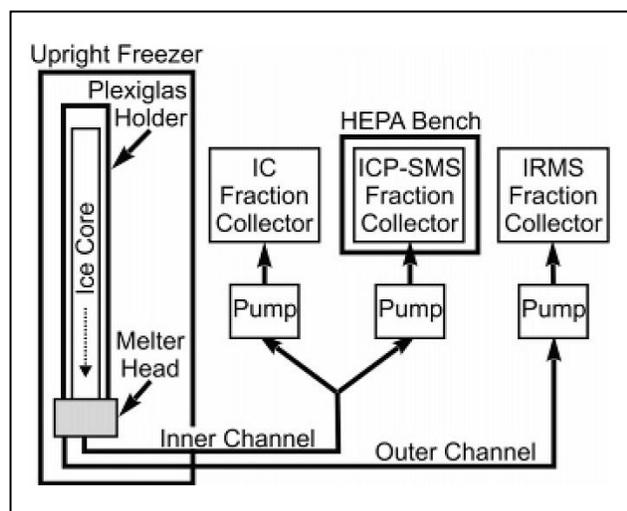
**Observaciones:** la columna 2 es utilizada por fin de la vida útil de la columna 1.

### 5.1.3. Muestras

Las muestras analizadas corresponden a fracciones de un testigo de hielo recolectado en Antártica, de acuerdo a protocolos específicos, por la ITASE en el verano de 2004/2005.

La fusión y almacenamiento de las muestras se desarrolló de acuerdo a lo descrito por Osterberg y col. [2006], en las dependencias del *Climate Change Institute* (Universidad de Maine, Estados Unidos), a cargo del Dr. Paul Mayewski y dirigido por el Dr. Jefferson Simoes. Los testigos de hielo y nieve permanecieron desde su arribo a Estados Unidos, en una habitación fría, donde fueron desembalados, medidos y limpiados.

El protocolo de fusión del testigo incluyó una etapa de limpieza de las muestras, en la cual se retiró entre 3-6 mm de la capa más externa de cada sección del testigo de hielo con un cuchillo de cerámica (ZrO), en una campana con flujo laminar clase 100, ubicada dentro de una cámara fría a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, las secciones fueron colocadas al interior de un tubo de polietileno de alta densidad (*Plexiglas*), especialmente diseñado para el proceso de fusión en continuo. Para la etapa de fusión se trasladó el tubo de *Plexiglas* a una cámara frigorizada a  $-10^{\circ}\text{C}$ , ubicada en una habitación limpia clase 100, para reducir y evitar el riesgo de contaminación. El tubo fue puesto en el equipo de fusión en continuo (figura 7) realizándose la fusión entre  $18$  y  $25^{\circ}\text{C}$ , en un tiempo aproximado de 2,5 horas por cada 90 cm de hielo. La cabeza de fusión de níquel incluyó una sección de salida de la sección externa del cilindro de hielo y otra sección para la salida de la fracción interna, de la cual fueron separadas las fracciones acuosas para el presente estudio.



**Figura 7.** Representación esquemática del sistema de fusión utilizado para la obtención de muestras a partir de un testigo de hielo [Osterberg y col., 2006]

Los contenedores utilizados para las muestras acuosas fueron frascos de vidrio color ámbar provistos de tapas de teflón, previamente desactivados por contacto del material con DMCS al 5% en tolueno por 30 segundos, seguido por 2 enjuagues con tolueno y 3 con metanol y secado a 25 °C.

Posteriormente se realizó la selección de las muestras de un testigo de hielo (IC-5); las cuales fueron llevadas a la Universidad Federal de Rio Grande do Sul (UFRGS, Porto Alegre, Brasil) donde se realizó una nueva fusión de cada fracción en habitación limpia clase 1000 a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezclaron alícuotas de 2 mL cada 10 muestras agrupadas según las secciones originales del testigo de hielo descritas en la tabla 2, con pipetas volumétricas en campana con flujo laminar clase 100. Las nuevas muestras obtenidas se almacenaron en frascos de vidrio ámbar con tapas de teflón previamente desactivados, manteniéndose almacenadas a -10°C en un congelador hasta su traslado a Chile, donde fueron conservadas en las mismas condiciones antes descritas en el laboratorio de Nutrición Vegetal, de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, hasta su nueva fusión a temperatura ambiente, previo a la extracción y análisis químico.

El testigo de hielo IC-5 fue colectado a 82°30'30,8" S y 79°28'02,7" O, a una altitud de 950 m. Presentó una temperatura de -29°C a los 10 m de profundidad y su longitud total fue de 42,51 m; sin embargo, las muestras disponibles para esta tesis corresponden a muestras superficiales de los primeros 6 m de profundidad. En la tabla 2 se detallan las características de cada una de las muestras compuestas analizadas, donde  $M_i$  corresponde a la muestra inicial del grupo mezclado y  $M_f$  a la última muestra de dicho grupo. Cabe mencionar que de acuerdo a información entregada por el Dr. Jefferson Simoes en abril de 2012 la fracción estudiada abarca 4 años contando desde el verano 2000-2001.

**Tabla 2.** Descripción de muestras de testigo de hielo IC-5.

$M_i$  indica la muestra que inicia el intervalo de mezcla y  $M_f$  la muestra final del mismo, señalándose las profundidades de las bases de cada sección en el testigo de hielo.

<b>Muestra</b>	<b><math>M_i</math></b>	<b><math>M_f</math></b>	<b>Desde [m]</b>	<b>Hasta [m]</b>
<b>M22-30</b>	BR-04-5-22	BR-04-5-30	3,765	4,045
<b>M31-40</b>	BR-04-5-31	BR-04-5-40	4,080	4,395
<b>M41-50</b>	BR-04-5-41	BR-04-5-50	4,430	4,775
<b>M51-60</b>	BR-04-5-51	BR-04-5-60	4,810	5,130
<b>M61-70</b>	BR-04-5-61	BR-04-5-70	5,170	5,530
<b>M72-80</b>	BR-04-5-72	BR-04-5-80	5,620	5,780
<b>M81-90</b>	BR-04-5-81	BR-04-5-90	5,800	6,020

#### **5.1.4. Software**

- *Millenium 4.1*: adquisición y procesamiento de datos y control instrumental HPLC-DAD.
- *Statgraphics Centurion*: diseños experimentales y optimización.
- *Empower 2*: adquisición y procesamiento de datos y control instrumental HPLC-FLD.

## **5.2. Métodos**

### **5.2.1. Determinación de HAPs**

Se desarrolló inicialmente un método de separación cromatográfica para 15 de los HAPs en estudio, estableciéndose un programa en gradiente adecuado para HPLC y los correspondientes parámetros instrumentales para, posteriormente, hacerlo extensivo a 2 compuestos adicionales.

Previo a la calibración se determinó el espectro de absorción para cada compuesto para la elección de la longitud de onda de máxima sensibilidad mediante el detector de arreglo de diodos.

La sensibilidad requerida en el análisis de las muestras hizo necesario trabajar adicionalmente con un detector de fluorescencia, considerando la identificación realizada previamente por HPLC-DAD por igualación de espectros y tiempos de retención asociados.

#### **5.2.1.1. Método Cromatográfico HPLC-DAD**

Considerando las características físico-químicas de los primeros 15 HAPs (tabla 1, menos BaA y coroneno), se desarrolló el método de separación cromatográfica utilizando una disolución de éstos en acetonitrilo de concentración  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  a partir del ME1.

En la tabla 3 se encuentran los parámetros instrumentales utilizados para el estudio de la separación cromatográfica en gradiente utilizando como fase móvil acetonitrilo: agua.

**Tabla 3.** Parámetros instrumentales para HPLC-DAD.

$\lambda$ inicio [nm]	200
$\lambda$ final [nm]	300
Velocidad de muestreo [espectro s <sup>-1</sup> ]	1,0
Resolución [nm]	1,2
Modo bomba	Gradiente lineal
Flujo [mL min <sup>-1</sup> ]	1,1
Temperatura de columna [°C]	35
Purga de solventes [mL He min <sup>-1</sup> mL solvent <sup>-1</sup> ]	20
Volumen de inyección [ $\mu$ L]	20
Tiempo de medición [min]	30
Columna utilizada	1

Los espectros UV de cada compuesto fueron obtenidos por inyección individual de cada HAP (soluciones de 2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> en acetonitrilo, a partir de éstos fue creada una biblioteca en el *software* con las condiciones cromatográficas seleccionadas. Adicionalmente se realizó la elución de los 15 compuestos en solución de 2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> cloroformo:acetonitrilo (1:1), correspondiente al ME2.

### 5.2.1.2. Parámetros de Calidad Analítica del Método Cromatográfico HPLC-DAD

Una vez establecido el mejor gradiente para la separación de los analitos, se obtuvieron los límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC) instrumental.

Las curvas de calibración utilizadas incluyeron las siguientes concentraciones: 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 y 0,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Las soluciones se obtuvieron a partir del ME2, y los puntos respectivos fueron medidos en duplicado para calcular tanto los LD y LC, como para la determinar los parámetros de calidad de la ecuación de calibración, tales como sensibilidad analítica, para los 15 HAPs en estudio.

La linealidad se estableció a partir de la ecuación 3:

$$R = a + bC \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde  $R$  corresponde a la señal instrumental y  $C$  a la concentración del compuesto.

Para los cálculos de parámetros de calidad analítica se calculó la desviación estándar de la regresión  $S_{R/C}$ , Desviación estándar de la ordenada en el origen  $S_a$  y desviación estándar de la pendiente  $S_b$ .

La sensibilidad analítica  $S$  fue calculada a partir de la ecuación 4:

$$S = \frac{S_{R/C}}{b} \quad \text{Ecuación 4}$$

$LD$  y  $LC$  para un intervalo de confianza del 99% de acuerdo a las ecuaciones 5 y 6:

$$LD = 3 \left( \frac{S_{R/C}}{b} \right) \left[ \frac{n-2}{n-1} \right]^{1/2} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$LC = 10 \left( \frac{S_{R/C}}{b} \right) \left[ \frac{n-2}{n-1} \right]^{1/2} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde  $n$  corresponde al número de pares de datos.

### 5.2.2. HLLE

La aplicación de este método de extracción se estudió considerando dos criterios principales: factibilidad y optimización de los parámetros involucrados en la extracción a través de diseños multivariados, teniendo en cuenta los antecedentes previos de la literatura. Para ello se realizó un estudio de la relación entre el volumen de extracto obtenido y los principales factores que afectan la extracción a través de un diseño *Doehlert*. Posteriormente se utilizó un diseño experimental del tipo factorial completo para determinar los parámetros que influyen en la extracción de los HAPs desde la solución acuosa y, finalmente, se optimizó la metodología por medio del diseño factorial. A partir del método optimizado se obtuvieron los correspondientes parámetros de calidad analítica de la extracción.

La HLLE se realizó en un tubo troncocónico con la solución acuosa contaminada con los 15 HAPs de interés (tabla 1, menos coroneno y BaA), sobre la cual se adicionó una mezcla de metanol (solvente de consoluto) y cloroformo (solvente extractante); posteriormente se agitó manualmente, generándose una solución homogénea, que se separó por adición de NaCl.

La agitación de la solución homogénea fue realizada manualmente por 1 minuto. En la adición de NaCl también se realizó agitación manual hasta lograr la completa disolución de la sal, a temperatura ambiente. El extracto se obtuvo por centrifugación de la mezcla turbia, por 10 minutos a 3500 rpm, siendo retirado desde el fondo del tubo con una jeringa de 100  $\mu$ L de punta roma.

Dicho extracto se llevó a viales para HPLC y diluyó con acetonitrilo, en relación 1:1, para evitar problemas operacionales en la introducción de la muestra en la fase móvil y a la vez evitar cambios de concentración por rápida volatilización de cloroformo.

Los porcentajes de extracción (%*E*) y factores de enriquecimiento (*FE*) se calcularon según las siguientes ecuaciones:

$$\%E = \frac{m_f}{m_i} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde  $m_i$  corresponde a la masa inicial de cada compuesto en la muestra y  $m_f$  a la masa en el extracto final de cada compuesto.

$$FE = \frac{C_f}{C_i} \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde  $C_i$  corresponde a la concentración inicial de cada compuesto en la muestra y  $C_f$  a la concentración de cada compuesto en el extracto final.

### 5.2.2.1. Estudio del Volumen de Extracto por Diseño *Doehlert*

En el diseño *Doehlert* el número de niveles no es el mismo para todos los factores en estudio. Esta propiedad permite la libre selección en la asignación del número de niveles de acuerdo al detalle en que se quiera estudiar cada factor. Para obtener el efecto de cada factor sobre la respuesta, estos deben ser codificados para eliminar la influencia de las diferentes magnitudes en la evaluación [Brum y col., 2008].

Para encontrar la relación entre recuperación de cloroformo (extracto) y los parámetros que podrían influir en ésta, se utilizó un diseño *Doehlert* 3:5:7, considerándose como factores el volumen de metanol, la concentración de NaCl y el volumen de cloroformo adicionado. La respuesta se expresó en porcentaje de cloroformo recuperado. El volumen de muestra (agua nanogrado) permaneció fijo y fue de 3,5 mL.

Se consideraron 7 niveles para el factor volumen de cloroformo adicionado, considerando volúmenes entre 60 y 180  $\mu\text{L}$ . Para NaCl se asignaron 5 niveles, incluyendo concentraciones de 5 a 15 % m/v. Finalmente, para volumen de metanol los 3 niveles considerados fueron 0,6, 0,9 y 120  $\mu\text{L}$ . La matriz codificada se muestra en la tabla 4. Los experimentos 6 y 12 fueron repetidos 4 veces y el centro se realizó en triplicado. El número de experimentos requerido está dado por la ecuación 2.

**Tabla 4.** Matriz de diseño *Doehlert* para volumen de cloroformo recuperado en el extracto.

<b>N° de Experimento</b>	<b>Concentración de NaCl</b>	<b>Volumen de Cloroformo</b>	<b>Volumen de Metanol</b>
1	0	0	0
2	1	0	0
3	0,5	0,866	0
4	0,5	0,289	0,817
5	-1	0	0
6	-0,5	-0,866	0
7	-0,5	-0,289	-0,817
8	0,5	-0,866	0
9	0,5	-0,289	-0,817
10	0	0,577	-0,817
11	-0,5	0,866	0
12	-0,5	0,289	0,817
13	0	-0,577	0,817
1a	0	0	0
1b	0	0	0
6a	-0,5	-0,866	0
6b	-0,5	-0,866	0
6c	-0,5	-0,866	0
12a	-0,5	0,289	0,817
12b	-0,5	0,289	0,817
12c	-0,5	0,289	0,817

### **5.2.2.2. Estudio Exploratorio del Efecto de los Factores Experimentales en la Extracción**

Se seleccionó un diseño factorial completo a dos niveles ( $2^4$ ). Los factores considerados fueron volumen de muestra, volumen de metanol, volumen de cloroformo y concentración de NaCl; así con los 4 factores seleccionados se realizaron 16 experimentos con 2 centros. Las variables correspondieron a los porcentajes de extracción de los 15 HAPs iniciales, expresadas como respuesta única D, correspondiente a la función de compromiso de las respuestas múltiples obtenidas. Se usó para estos fines una solución acuosa contaminada con los 15 HAPs a un nivel de concentración de  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , constituyéndose en la muestra a extraer en las condiciones de cada uno de los experimentos. Esta se preparó a partir de la solución ME1. Las concentraciones en los extractos fueron determinadas utilizando una curva de calibración para la cuantificación simultánea de todos los analitos.

La curva de calibración fue preparada a partir del ME2 y sus concentraciones se muestran en la tabla 5. Para la medición mediante HPLC-DAD, se usaron las condiciones óptimas definidas en los experimentos previos.

**Tabla 5.** Concentraciones (c) en curva de calibración preparadas a partir de ME2.

HAP	c1 [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	c2 [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	c3 [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	c 4 [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	c5 [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]
BaP	0,24	0,384	0,48	0,96	2,4
DahA	0,22	0,352	0,44	0,88	2,2
Acenaftileno	0,28	0,448	0,56	1,12	2,8
Fenantreno	0,22	0,352	0,44	0,88	2,2
Antraceno	0,26	0,416	0,52	1,04	2,6
BghiP	0,28	0,448	0,56	1,12	2,8
I123cdP	0,24	0,384	0,48	0,96	2,4
Naftaleno	0,32	0,512	0,64	1,28	3,2
Acenafteno	0,26	0,416	0,52	1,04	2,6
Criseno	0,18	0,288	0,36	0,72	1,8
BbF	0,22	0,352	0,44	0,88	2,2
BkF	0,22	0,352	0,44	0,88	2,2
Fluoranteno	0,2	0,32	0,4	0,8	2
Pireno	0,24	0,384	0,48	0,96	2,4
Fluoreno	0,22	0,352	0,44	0,88	2,2

En la tabla 6 se observa la matriz de diseño experimental. Los niveles considerados incluyeron para metanol volúmenes de 0,8 y 1,2 mL, para cloroformo volúmenes de 60 y 100  $\mu$ L, para muestra volúmenes de 2,5 y 3,5 mL y para NaCl concentraciones de 12 y 15 % m/v.

**Tabla 6.** Efecto de los factores experimentales en la extracción: matriz de diseño experimental.

<b>N° experimento</b>	<b>Volumen de muestra</b>	<b>Volumen de metanol</b>	<b>Volumen de cloroformo</b>	<b>Concentración de NaCl</b>
1	0	0	0	0
2	-1	-1	-1	-1
3	1	-1	-1	-1
4	-1	1	-1	-1
5	1	1	-1	-1
6	-1	-1	1	-1
7	1	-1	1	-1
8	-1	1	1	-1
9	1	1	1	-1
10	-1	-1	-1	1
11	1	-1	-1	1
12	-1	1	-1	1
13	1	1	-1	1
14	-1	-1	1	1
15	1	-1	1	1
16	-1	1	1	1
17	1	1	1	1
18	0	0	0	0

### **5.2.2.3. Optimización**

En esta etapa se utilizó un diseño factorial a tres niveles con tres factores ( $3^3$ ), es decir, se realizaron 27 experimentos + 4 centros (tabla 7)

Los factores considerados fueron concentración de NaCl, volumen de metanol y volumen de cloroformo, dejando el volumen de muestra fijo en 3,5 mL.

La concentración de cada uno de los 15 HAPs en la solución acuosa de trabajo fue  $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$  a partir de la solución ME1. Las determinaciones fueron realizadas por HPLC-DAD. En la tabla 7 se establecen los experimentos en la matriz para este diseño.

**Tabla 7.** Optimización: matriz de diseño factorial a 3 niveles para 3 factores.

<b>N° de Experimento</b>	<b>Concentración de NaCl</b>	<b>Volumen de Metanol</b>	<b>Volumen de Cloroformo</b>
1	0	0	0
2	-1	-1	-1
3	0	-1	-1
4	1	-1	-1
5	-1	0	-1
6	0	0	-1
7	1	0	-1
8	-1	1	-1
9	0	1	-1
10	1	1	-1
11	0	0	0
12	-1	-1	0
13	0	-1	0
14	1	-1	0
15	-1	0	0
16	0	0	0
17	1	0	0
18	-1	1	0
19	0	1	0
20	1	1	0
21	0	0	0
22	-1	-1	1
23	0	-1	1
24	1	-1	1
25	-1	0	1
26	0	0	1
27	1	0	1
28	-1	1	1
29	0	1	1
30	1	1	1
31	0	0	0

#### **5.2.2.4. Parámetros de Calidad Analítica del Método HPLE-HPLC-DAD**

En la determinación estadística de LC, LD y sensibilidad analítica y la evaluación de la linealidad del método analítico, se utilizó un volumen de muestra de 3,5 mL, volumen de metanol de 1,2 mL, volumen de cloroformo de 120  $\mu\text{L}$  y 10 % m/v de NaCl. Se utilizaron las mismas ecuaciones descritas anteriormente.

Las concentraciones de las muestras acuosas para los 15 HAPs fueron 0,008; 0,01; 0,015; 0,025 y 0,05  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Cada muestra se realizó por triplicado. El volumen de extracto obtenido fue diluido con acetonitrilo, en relación 1:1, para su medición cromatográfica por HPLC-DAD.

Además se obtuvieron los valores de LD y LC del método experimentalmente, para lo cual se realizaron 10 repeticiones simultáneamente en las mismas condiciones para una muestra de concentración de 0,020  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , considerando un volumen de muestra de 3,5 mL, volumen de metanol de 1,2 mL, volumen de cloroformo de 120  $\mu\text{L}$  y 10 % m/v de NaCl.

Para evaluar la precisión y exactitud del método se realizaron pruebas de recuperación, en quintuplicado con las condiciones optimizadas antes mencionadas. La concentración utilizada fue de 0,020  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **5.2.3. Método Cromatográfico HPLC-FLD.**

Considerando información obtenida en el trabajo experimental previo, se estableció un segundo método de separación cromatográfica utilizando detección por fluorescencia, para el cual se seleccionaron parámetros instrumentales adecuados (tabla 8), según información bibliográfica y las pruebas de laboratorio. Se consideraron en esta sección naftaleno, fenantreno, antraceno, fluoreno, acenafteno, fluoranteno, pireno, BaA, criseno, BbF, BkF, BaP, DahA, BghiP, I123cdP y coroneno (tabla 1 menos acenaftileno).

**Tabla 8.** Parámetros instrumentales utilizados para HPLC-FLD.

$\lambda$ excitación [nm]	220/250/292/300
$\lambda$ emisión [nm]	330/375/410/500
Velocidad de muestreo [espectro s <sup>-1</sup> ]	1,0
Resolución [nm]	1,2
Modo bomba	Gradiente lineal
Flujo [mL min <sup>-1</sup> ]	1,4
Temperatura de columna [°C]	35
Purga de solventes [mL He min <sup>-1</sup> mL solvente <sup>-1</sup> ]	20
Volumen de inyección [ $\mu$ L]	20
Tiempo de medición [min]	40
Columna utilizada	2
Ganancia utilizada	10

### 5.2.3.1. Parámetros de Calidad Analítica de Método Cromatográfico HPLC-FLD

A través de curvas de calibración se obtuvieron linealidad, sensibilidad analítica, LD y LC instrumentales, para un intervalo de confianza del 99% a través de las ecuaciones 1, 2, 3 y 4. Las concentraciones para cada analito fueron: 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,7 y 2,6 ng mL<sup>-1</sup>.

Las soluciones se obtuvieron a partir del ME2 por diluciones con la mezcla de solventes acetonitrilo:cloroformo, en relación 1:1; los respectivos puntos fueron medidos en triplicado.

### 5.2.3.2. Parámetros de Calidad Analítica del Método HPLC-FLD

Para la determinación estadística de LC, LD y sensibilidad analítica y la evaluación de la linealidad del método final se utilizaron las mismas condiciones ya descritas para la extracción.

Las concentraciones de las muestras acuosas para los HAPs fueron 0,03; 0,05; 0,07; 0,09 y 0,11 ng mL<sup>-1</sup>. Cada muestra se determinó por triplicado. El volumen de extracto obtenido fue diluido con acetonitrilo en relación 1:1 para su medición cromatográfica por HPLC-FLD.

Para evaluar la precisión y exactitud del método se realizaron pruebas de recuperación, en triplicado. Las concentraciones iniciales utilizadas estuvieron entre 0,048 y 0,13  $\text{ng mL}^{-1}$  para los compuestos en estudio.

### **5.3. Análisis de Muestras por HLLE-HPLC-FLD**

Las muestras fueron extraídas por HLLE. Se utilizó un volumen de muestra de 3,5 mL, volumen de metanol de 1,2 mL, volumen de cloroformo de 120  $\mu\text{L}$  y 10 % m/v de NaCl.

Las curvas de calibración corresponden a diluciones del ME2 en acetonitrilo: cloroformo 1:1, en triplicado. Las concentraciones de las soluciones patrones de todos los HAPs utilizadas fueron las siguientes: 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,7 y 2,6  $\text{ng mL}^{-1}$ .

Las ecuaciones de regresión fueron determinadas por el método de los mínimos cuadrados. Cada muestra fue extraída y medida inmediatamente por HPLC-FLD, en duplicado, considerándose blancos analíticos, correspondientes a agua nanogrado sometida al proceso completo, los cuales fueron inyectados al inicio, centro y final de las mediciones por HPLC-FLD, a fin de asegurar la calidad de los resultados obtenidos.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Método Cromatográfico HPLC-DAD

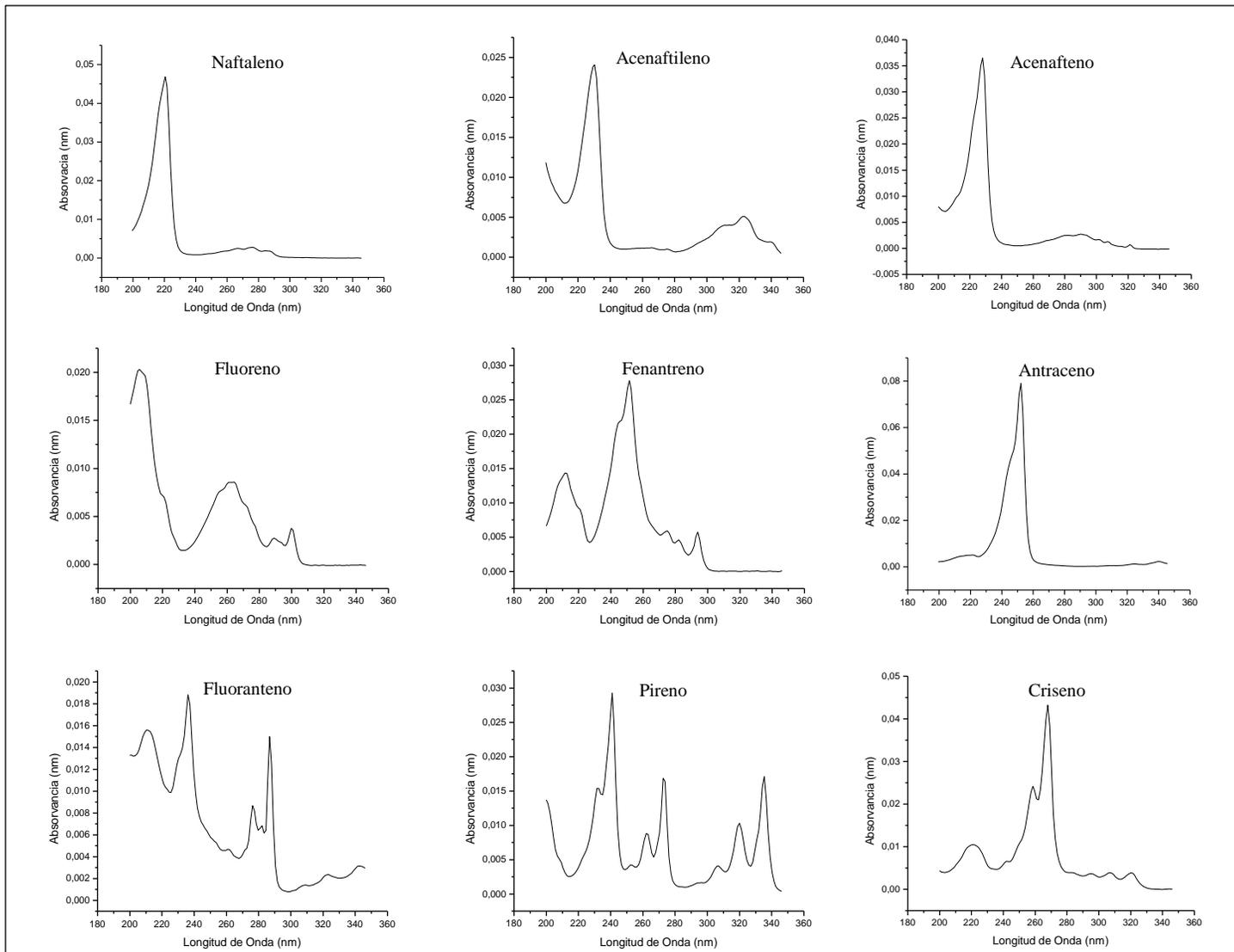
#### 6.1.1. HPLC-DAD

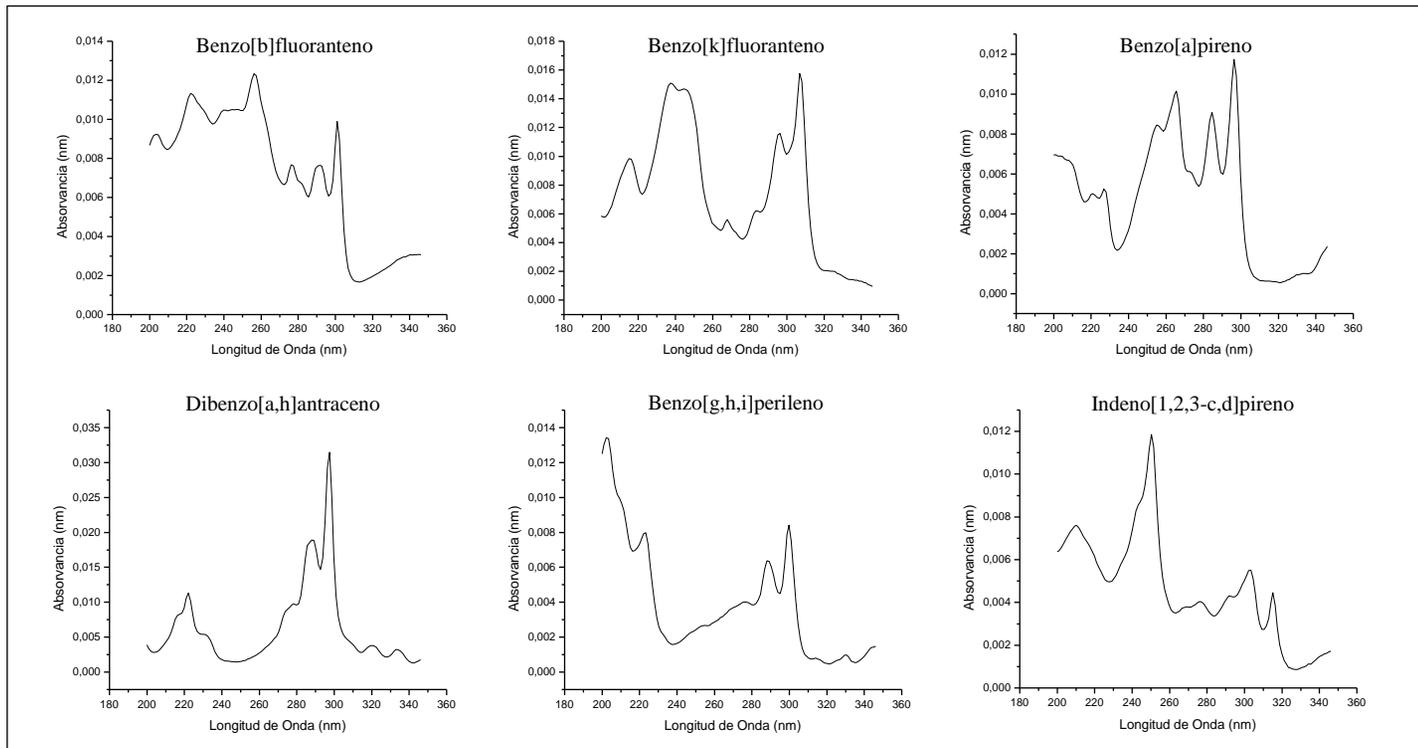
Para la obtención de una buena resolución se optimizó un programa de elución en gradiente. Los resultados se interpretaron utilizando los parámetros de evaluación de pureza de *peak* e igualación de espectros a través de contraste espectral que entrega el *software* de manejo de datos del detector de arreglo de diodos. De acuerdo a ello se estableció el gradiente de elución presentado en la tabla 9 para la mejor resolución de la mezcla de HAPs.

**Tabla 9.** Programa en gradiente agua: acetonitrilo utilizado para la separación cromatográfica.

Tiempo [min]	Acetonitrilo [%]	Agua [%]
0-2	40	60
2-20	100	0
20-23	40	60
23-30	40	60

A partir de los espectros de absorción obtenidos (figura 8) para cada compuesto en las condiciones de elución antes señaladas, se identificaron las longitudes de onda a la cual se encuentra el máximo de absorción, permitiendo con ello la mejor sensibilidad analítica para su determinación cuantitativa. Así, se agruparon los diferentes compuestos en 5 longitudes de onda para la cuantificación.





**Figura 8.** Biblioteca de Espectros UV para los 15 HAPs estudiados por HPLC-DAD.

En la tabla 10 se muestran los tiempos de retención obtenidos y la longitud de onda seleccionada para cada analito.

**Tabla 10.** Tiempos de retención y longitud de onda para la cuantificación

HAP	Tiempo de retención [min]	$\lambda$ [nm]
Naftaleno	6,84	220,5
Acenaftileno	8,32	220,5
Acenafteno	9,99	220,5
Fluoreno	10,50	262,5
Fenantreno	11,47	251,7
Antraceno	12,52	251,7
Fluoranteno	13,42	220,5
Pireno	14,10	239,7
Criseno	17,07	220,5
Benzo[b]fluoranteno	18,79	220,5
Benzo[k]fluoranteno	19,80	239,7
Benzo[a]pireno	20,64	262,5
Dibenzo[a,h]antraceno	22,17	299,7
Benzo[g,h,i]perileno	22,54	299,7
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	23,18	251,7

La separación de Benzo[b] fluoranteno y Benzo[k]fluoranteno, los cuales presentan el misma masa molar y similares valores de  $\log K_{OW}$  y solubilidad en agua, se hace particularmente difícil para los diferentes métodos cromatográficos, sin embargo la utilización de una columna diseñada especialmente para la determinación del conjunto de HAPs estudiados (columna 1), a lo que se sumó la posibilidad de cuantificarlos a una longitud de onda diferente, facilitó la detección de uno y otro pues presentan diferentes espectros de absorción, eliminándose así en gran medida la interferencia mutua que se podría presentar para su cuantificación.

Para el par de compuestos dibenzo[a,h]antraceno y benzo[g,h,i]perileno no se obtuvo la total separación, sin embargo esto se corrigió mediante las herramientas de integración del *software*. Con los espectros obtenidos se creó una biblioteca. La pureza e identidad de cada compuesto eluido se evaluó permanentemente mediante el contraste espectral, tanto para la comparación con los espectros de dicha biblioteca como para la comparación entre espectros

recogidos a lo largo de todo el cromatograma y en particular dentro de la señal correspondiente a cada compuesto. Así, se comprobó la ausencia de co-elución para todos los compuestos exceptuando el para antes mencionado.

La obtención de la separación de los quince compuestos en un tiempo menor a 24 minutos permitió el pronto re-equilibrio de la columna extendiéndose el tiempo total para cada cromatograma a sólo 30 minutos.

Finalmente, se realizó la inyección de los analitos en cloroformo: acetonitrilo, en relación 1:1, la solución utilizada fue de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  (ME2). De acuerdo a la comparación de los espectros y tiempos de retención, no se observó cambio en la elución de los analitos.

### **6.1.2. Parámetros de Calidad Analítica del Método Cromatográfico HPLC-DAD**

En la Tabla 11 se presentan los límites de detección y cuantificación instrumental logrados en las condiciones antes señaladas. En otro trabajo [Miège y col., 2003] se señalan límites de detección absolutos entre 0,3 y 12 ng, el primero para antraceno y el segundo para naftaleno, acenaftileno y acenafteno. En el presente estudio estos valores varían entre 0,034 para naftaleno y 0,426 ng para indeno [1,2,3-cd] pireno. Lo anterior es atribuible al hecho de haber empleado diferentes longitudes de onda a diferencia del caso anterior donde se cuantificó solo a 254 nm. Lo anterior permite concluir que en estas condiciones es posible utilizar la medición mediante absorción en el UV para los compuestos en estudio, sin embargo la posibilidad de utilizar detección por fluorescencia en la medición de las muestras puede ser requerida y el desarrollo de un programa de medición HPLC-FLD puede ser necesario por tratarse de muestras con concentraciones probables del orden de las ultra trazas.

**Tabla 11.** Límites de detección LD y de cuantificación LC para HPLC-DAD.

<b>HAP</b>	<b>LD [<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>]</b>	<b>LC [<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>]</b>	<b>LD [ng]</b>	<b>LC [ng]</b>
Naftaleno	0,0017	0,0056	0,034	0,112
Acenaftileno	0,0108	0,0361	0,216	0,722
Acenafteno	0,0119	0,0396	0,238	0,792
Fluoreno	0,0069	0,0231	0,138	0,462
Fenantreno	0,0119	0,0395	0,238	0,790
Antraceno	0,0126	0,0419	0,252	0,838
Fluoranteno	0,0197	0,0656	0,394	1,312
Pireno	0,007	0,0233	0,14	0,466
Criseno	0,0099	0,033	0,198	0,660
BbF	0,0178	0,0593	0,356	1,186
BkF	0,0169	0,0563	0,338	1,126
BaP	0,0148	0,0495	0,296	0,990
DahA	0,0037	0,0122	0,074	0,244
BghiP	0,0051	0,0171	0,102	0,342
I123cdP	0,0213	0,0711	0,426	1,422

En la tabla 12 se observan los parámetros de calidad de la ecuación de regresión para la calibración. Los valores de  $R^2$  dan cuenta de un muy buen ajuste lineal de los datos al modelo de regresión lineal, incluidos los compuestos de más difícil separación como es el caso de benzo[b]fluoranteno y benzo[k]fluoranteno. La mejor sensibilidad analítica se obtuvo para naftaleno y las peores para indeno[1,2,3-cd]pireno y fluoranteno.

**Tabla 12.** Parámetros de ecuación de regresión de la calibración y sensibilidad analítica obtenidos para HPLC-DAD.

HAP	a	S <sub>a</sub>	b	S <sub>b</sub>	S <sub>R/c</sub>	R <sup>2</sup>	(1- S <sub>b</sub> /b)	S [µg mL <sup>-1</sup> ]
Naftaleno	-7525	1285	316716	213	203,18	0,9999	0,9993	0,00064
Acenaftileno	-524	246	56326	1486	234,98	0,9979	0,9736	0,00417
Acenafteno	-2266	621	129796	3749	592,87	0,9975	0,9711	0,00456
Fluoranteno	-2248	590	74316	3558	562,69	0,9931	0,9521	0,00757
Criseno	329	208	52279	1259	199,19	0,9982	0,9759	0,00381
BbF	-1742	737	102717	4445	702,93	0,9944	0,9567	0,00684
Pireno	-2696	518	184071	3126	494,40	0,9991	0,9830	0,00268
BkF	-4513	1117	163875	6741	1065,96	0,9949	0,9589	0,00650
Fenantreno	-1418	1771	2252720	66815	2296,35	0,9973	0,9703	0,00101
Antraceno	-4378	2417	476841	14576	2304,67	0,9972	0,9694	0,00483
I123cdP	-1179	675	78443	4074	644,27	0,9919	0,9481	0,00821
Fluoreno	3	143	51145	864	136,68	0,9991	0,9831	0,00267
BaP	-2487	692	115616	4176	660,30	0,9961	0,9639	0,00571
DahA	-1328	167	113762	1012,8	160,14	0,9997	0,9911	0,00140
BghiP	-117	102	49460	617	97,68	0,9995	0,9875	0,00076

## 6.2. Extracción Homogénea Líquido-Líquido HLLE.

En las investigaciones de Tavakoli y col. [2006], se establece que para obtener una buena sensibilidad, precisión y selectividad en la extracción y determinación de los HAPs, la selección de un adecuado solvente extractante es trascendental. Las características de un buen solvente de extracción incluyen extraer satisfactoriamente los analitos, separarse de las señales de los compuestos de interés y tener una mayor densidad que el agua. De acuerdo a los antecedentes bibliográficos se escogió cloroformo como solvente extractante y metanol como solvente de consoluta. En el sistema ternario agua/metanol/cloroformo, las moléculas de metanol pueden solvatar a las moléculas de cloroformo, obteniéndose una solución homogénea. Sin embargo, al adicionar NaCl este efecto de solvatación es suprimido y se produce la sedimentación de la fase hidrofóbica, consistente en parte del solvente extractante y los analitos extraídos. En dicha investigación se presentan condiciones experimentales optimizadas considerando la variación de una variable por vez, dejando las demás constantes, lo que lleva a obtener puntos críticos donde funciona bien la extracción. De acuerdo a lo anterior se debe llevar

a cabo una optimización de las condiciones de extracción al modificar alguna de las variables condicionadas, tal como el volumen de muestra (por disponibilidad). Por esta razón se consideró realizar una optimización considerando todas las variables involucradas, obteniendo una superficie de respuesta, que lleve a la obtención de un método robusto.

### **6.2.1. Estudio del Volumen de Extracto por Diseño *Doehlert*.**

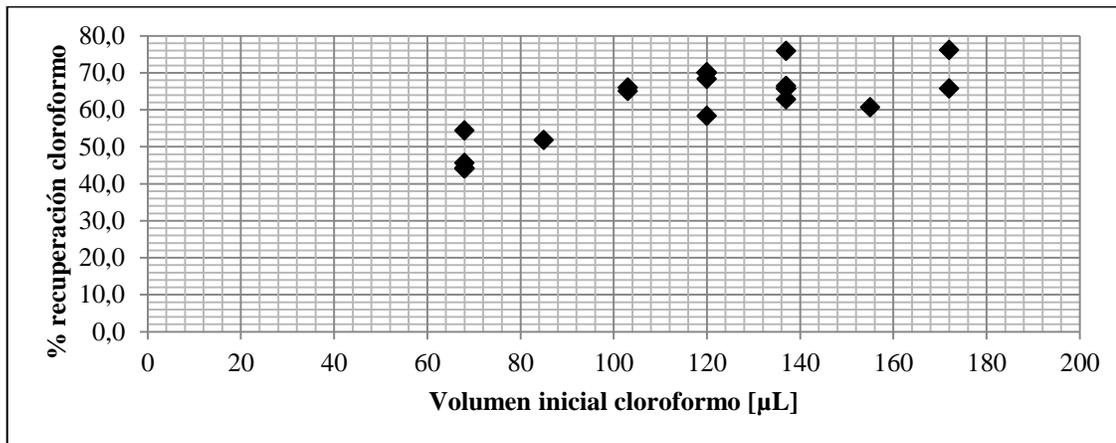
El diseño *Doehlert* permite que se estudien las variables a diferentes niveles, por lo que la que se desea investigar con mayor detalle se le asigna un mayor número de niveles; además, en caso de ser necesario puede ser ampliado agregando nuevos experimentos. En esta investigación se consideró que el volumen de cloroformo recuperado en el extracto era la primera respuesta que debía ser estudiada en detalle, por ser éste el extractante de los analitos desde la solución acuosa. Para ello se consideró como fundamental el volumen de cloroformo inicial estudiándose a 7 niveles. Se asignaron 5 niveles a cloruro de sodio y 3 a metanol; en la tabla 13 se muestra la matriz de experimentos decodificada y la respuesta obtenida como volumen de cloroformo recuperado. El diseño en estudio permitió conocer los límites del sistema experimental para la efectiva formación de la solución homogénea.

En la tabla 4 se muestra la matriz utilizada en este diseño, considerándose 4 puntos centrales y 3 experimentos replicados a fin de aumentar los grados de libertad del modelo. Lo que permite, por ejemplo, realizar una prueba sobre los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos a través del estadístico de Durbin-Watson. De acuerdo a los grados de libertad disponibles se puede evaluar el error puro o experimental, si hay experimentos replicados es posible determinarlo considerando que está asociado al error de los residuos.

**Tabla 13.** Matriz decodificada y volumen de cloroformo recuperado en el extracto.

<b>N° de Experimento</b>	<b>NaCl [%m/v]</b>	<b>Cloroformo [<math>\mu</math>L]</b>	<b>CH<sub>3</sub>OH [mL]</b>	<b>Cloroformo recuperado [<math>\mu</math>L]</b>
1	10	120	0,9	82
2	15	120	0,9	84
3	12,5	172	0,9	131
4	12,5	137	1,1	104
5	5	120	0,9	70
6	7,5	68	0,9	31
7	7,5	103	0,7	67
8	12,5	68	0,9	37
9	12,5	103	0,7	68
10	10	155	0,7	94
11	7,5	172	0,9	113
12	7,5	137	1,1	86
13	10	85	1,1	44
1a	10	120	0,9	84
1b	10	120	0,9	84
6a	7,5	68	0,9	30
6b	7,5	68	0,9	30
6c	7,5	68	0,9	30
12a	7,5	137	1,1	90
12b	7,5	137	1,1	90
12c	7,5	137	1,1	91

Se obtuvieron recuperaciones entre el 44% y el 76% del cloroformo inicial, siendo significativo en estos resultados el volumen de cloroformo agregado inicialmente (figura 9).



**Figura 9.** Porcentaje de recuperación de cloroformo en función del volumen adicionado.

El análisis de varianza (ANOVA) evalúa la variación asociada a los factores y al error puro, permitiendo conocer y comparar los diferentes errores asociados a un modelo predictivo. Así permite, por ejemplo, simplificar un modelo al eliminar factores cuyo efecto no sea significativo sobre la respuesta. Debido a que las diferencias entre resultados obtenidos para experimentos replicados fueron bajas dando cuenta de un bajo error experimental varios factores resultan ser significativos. El análisis de varianza correspondiente indica que los efectos significativos en la respuesta expresada como porcentaje de recuperación de cloroformo (extracto) corresponden a: volumen de cloroformo, NaCl adicionado y las interacciones NaCl/CH<sub>3</sub>OH y cloroformo/CH<sub>3</sub>OH como factores positivos y los términos cuadráticos como negativos, lo que puede observarse en la figura 10. Las interacciones de segundo orden indican curvaturas, en términos prácticos permiten determinar máximos o mínimos.

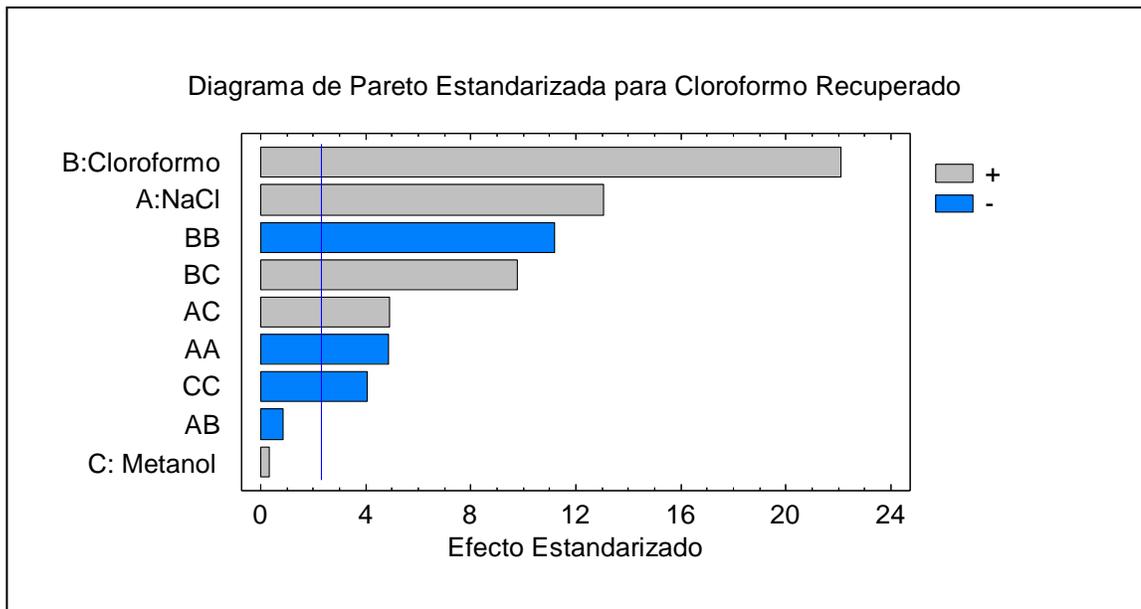
La carta Pareto (figura 10) muestra cada uno de los efectos en orden decreciente. El largo de cada barra es proporcional al efecto estandarizado, es decir, al coeficiente del modelo dividido por su error estándar de acuerdo al estadígrafo t (*Test de Student*) obtenido experimentalmente, el cual es presentado como la línea perpendicular al eje de las abscisas en la carta Pareto. Este diseño tiene más experimentos que los coeficientes que describen al modelo (ecuación 9), por lo tanto hay grados de libertad disponibles siendo posible realizar el *Test de Student*.

Entre los factores estudiados, el volumen de cloroformo inicial es el de mayor significancia, sin embargo de las interacciones se puede desprender el efecto de los demás

factores que explicarían el comportamiento observado en la figura 10, donde hay una tendencia a la recuperación de un máximo, a partir del cual la relación se hace independiente del volumen de cloroformo agregado. La concentración de cloruro de sodio tiene un efecto significativo importante en la respuesta, ya que a través del cambio en la fuerza iónica permite la separación de fases; ello se ve reflejado en la interacción NaCl/ CH<sub>3</sub>OH con un efecto positivo, es decir a mayor relación entre ambos componentes del sistema el metanol presentará menor capacidad para mantener el cloroformo solubilizado en agua, haciéndose el sistema independiente de la cantidad presente de metanol. . El modelo que describe el sistema es el siguiente:

$$\begin{aligned} \%CHCl_3 \text{ recuperado} &= 69,43 + 7,30 \cdot NaCl + 11,80 \cdot CHCl_3 + 0,17 \cdot CH_3OH - 5,28 \\ &\cdot NaCl^2 - 1,05 \cdot NaCl \cdot CHCl_3 + 6,58 \cdot NaCl \cdot CH_3OH - 11,36 \\ &\cdot CHCl_3^2 + 14,42 \cdot CHCl_3 \cdot CH_3OH - 3,98 \cdot CH_3OH^2 \end{aligned} \quad \text{Ecuación 9}$$

La solubilidad del cloroformo en agua a 20° C es de 0,822 g mL<sub>agua</sub><sup>-1</sup>; como el volumen de muestra permaneció fijo en 3,5 mL y considerando que el sistema de extracción incluye un tercio del volumen total de metanol, se esperaba una influencia negativa del volumen del mismo, sin embargo dentro del intervalo estudiado no fue significativo.



**Figura 10.** Carta Pareto para el diseño *Doehlert* de recuperación de Cloroformo.

El modelo aplicado presentó un  $R^2$  de 97,79 % que implica que el 97,79% de la variabilidad en la recuperación de cloroformo es explicada por el modelo. Es importante señalar que en los casos en que la razón cloroformo/metanol fue mayor a 0,12 no se formaba la fase homogénea, obteniéndose volúmenes variables del cloroformo adicionado separados inmediatamente como fase sedimentada. Ello también explicaría el efecto positivo observado respecto al volumen de cloroformo adicionado en la recuperación del mismo. Esto se relaciona con la necesidad de tener una cantidad suficiente de moléculas de metanol para la solvatación de las moléculas de cloroformo en el sistema. Teniendo en consideración que la formación de fase homogénea previa a la separación de fases es fundamental para la extracción de los compuestos, por lo tanto se consideró como limitante la razón 0,12 entre cloroformo y metanol en el diseño experimental posterior. El error medio absoluto fue de 1,53, correspondiente al valor promedio de los residuos; el error estándar fue de 1,50 y el estadístico de Durbin-Watson fue 2,35, con  $P=0,60$ , esto implica que no hay autocorrelación entre los residuos, con un nivel de significancia del 5%. Además, el diseño resultó ser perfectamente ortogonal, lo que implica que los resultados pueden ser interpretados sin dificultad ya que el grado de confusión de los efectos es nulo

### **6.2.2. Estudio Exploratorio del Efecto de los Factores Experimentales en la Extracción**

Se escogió un diseño factorial completo a dos niveles, el cual se utiliza para determinar los factores o interacciones entre dos o más factores con efecto significativo sobre la respuesta y estimar la magnitud de tales efectos, considerando un pequeño número de experimentos, pero representativos del proceso.

De acuerdo al objetivo de este estudio se deben considerar las respuestas simultáneas de los 15 HAPs. La respuesta de cada analito se expresó como porcentaje de extracción desde la solución acuosa utilizada como muestra, contaminada a un nivel de concentración de  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Las concentraciones obtenidas en los extractos fueron calculadas a partir de la correspondiente curva de calibración. Las múltiples respuestas obtenidas fueron expresadas en una respuesta única  $D$ , correspondiente a la función de *Derringer* o comúnmente llamada función de conveniencia. Esta permitió realizar la evaluación de los factores en estudio en la extracción simultánea de los 15 HAPs. Los valores predichos para cada respuesta son

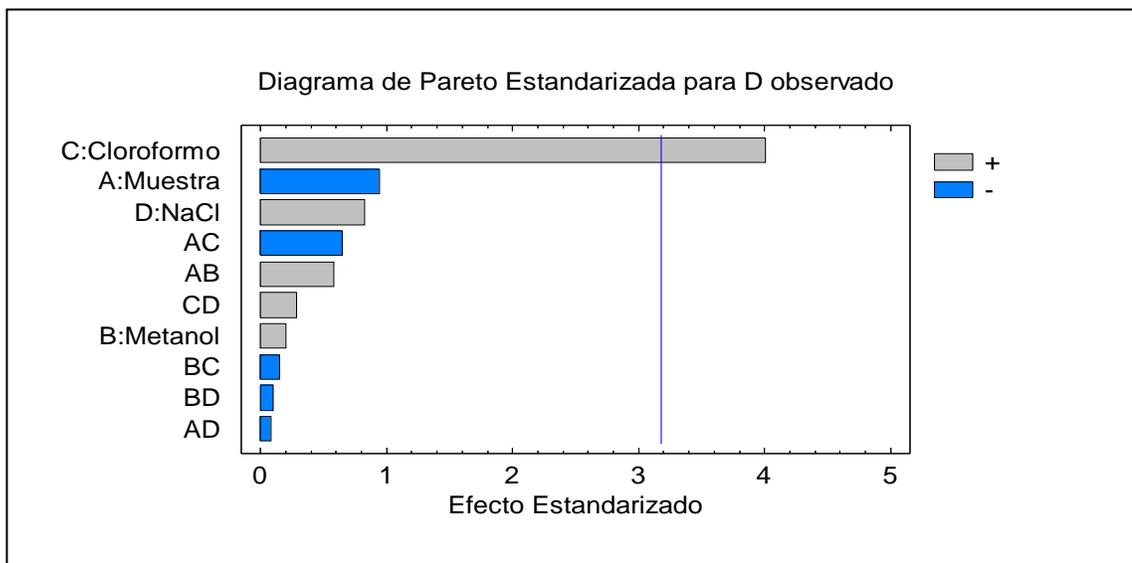
transformados a una escala adimensional  $d$ , donde valores de  $d=0$  representan valores no deseables y  $d=1$  a valores completamente deseables, así se obtiene  $D$  de acuerdo al tipo de respuesta buscada (máxima o mínima), por combinación de los valores  $d$  individuales, aplicando en este caso la media geométrica, puesto que todas las respuestas tienen la misma importancia. Los valores de  $D$  observados para cada experimento se encuentran en la tabla 14.

**Tabla 14.** Matriz de diseño experimental y valores de  $D$  para la recuperación simultánea de los 15 HAPs

N° experimento	Muestra [mL]	CH <sub>3</sub> OH [mL]	CHCl <sub>3</sub> [μL]	NaCl [% m/v]	D observado
1	3	1	80	13,5	0,380043
2	2,5	0,8	60	12	0,285983
3	3,5	0,8	60	12	0,165285
4	2,5	1,2	60	12	0
5	3,5	1,2	60	12	0,476611
6	2,5	0,8	100	12	0,677628
7	3,5	0,8	100	12	0,637569
8	2,5	1,2	100	12	0,863915
9	3,5	1,2	100	12	0,510359
10	2,5	0,8	60	15	0,406085
11	3,5	0,8	60	15	0,274102
12	2,5	1,2	60	15	0,399763
13	3,5	1,2	60	15	0,359385
14	2,5	0,8	100	15	0,877066
15	3,5	0,8	100	15	0,705796
16	2,5	1,2	100	15	0,802353
17	3,5	1,2	100	15	0,741119
18	3	1	80	13,5	0,468294

En la figura 11 se muestra que realizando el análisis estadístico a través de la respuesta  $D$ , el único factor que tiene un efecto significativo corresponde al volumen de cloroformo. Volúmenes mayores favorecen la eficiencia de la extracción en los límites estudiados, recordando que estos fueron seleccionados de acuerdo a lo observado en la sección anterior, no superando el valor 0,11 para la razón cloroformo: metanol. Los niveles seleccionados para el volumen de muestra fueron estimados de acuerdo a la cantidad de muestra real disponible. Los resultados indican que este factor en estas condiciones no es significativo, sin embargo, el

intervalo de estudio fue pequeño, por lo que para otras aplicaciones es recomendable contemplar este factor, debido a que a volúmenes mayores es de esperar cierto grado de disolución de cloroformo. Por otra parte sería esperable que con el aumento del volumen de muestra y la posibilidad de aumentar los factores de enriquecimiento se incremente la sensibilidad del método con un aumento de las señales cromatográficas de los analitos. Se consideró que como la solución homogénea se obtiene por efecto de la solvatación del cloroformo con metanol en el agua y ya que la separación de fases se produce al adicionar NaCl, entonces la concentración de la sal debe ser significativa, sin embargo, en estos niveles no lo fue, por esta razón en la etapa de optimización tanto la concentración de NaCl como el volumen de metanol fueron factores considerados.



**Figura 11.** Carta Pareto del diseño experimental.

En la tabla 15 se muestran los porcentajes de recuperación de cada uno de los analitos para cada experimento dentro del diseño y en la tabla 16 se encuentran los porcentajes de extracción promedio, mínimo y máximo para cada compuesto en estudio. Se buscó evaluar los resultados teniendo en consideración las distintas propiedades físicas y químicas de los compuestos en relación con el comportamiento de recuperación, sin embargo no se observó una tendencia particular.

De un análisis general de los datos se desprende que el método permite recuperaciones superiores a un 30%, alcanzándose para algunos analitos y algunos experimentos valores

superiores al 80%. Los valores más altos encontrados correspondieron a naftaleno, acenaftileno y BghiP y los más bajos a pireno y criseno, donde no se supera en general el valor 50%. Teniendo en cuenta estos resultados se procedió a la búsqueda de un sistema optimizado para obtener los más altos porcentajes dentro de los límites operacionales previamente mencionados.

Cabe mencionar que, de acuerdo a observaciones realizadas en el laboratorio, se buscó tener un volumen en el vial que permitiera la inyección automática de la muestra controlando en el muestreador la altura desde la cual se toma ésta para evitar la entrada de aire. Por otra parte se procuró introducir el mínimo volumen de cloroformo al equipo (20  $\mu$ L de muestra) para evitar problemas con los sellos y conexiones internas del mismo, pero manteniendo la cantidad necesaria para el buen desarrollo del trabajo analítico, evitando la evaporación de cloroformo, lo que llevaría a la concentración de la muestra o a la co-volatilización de aquellos analitos más volátiles.

**Tabla 15.** Porcentajes de extracción de cada HAP en los experimentos del estudio exploratorio

N° exp	Naftaleno	Pireno	I123cdP	DahA	Acenaftileno	Acenafteno	Fluoranteno	Criseno	BkF	Fenantreno	Antraceno	Fluoreno	BaP	BghiP	BbF
1	79,1	35,4	58,5	48,5	77,2	65,2	56,6	43,5	46,5	46,5	53,6	54,4	46,1	72,7	49,1
2	75,4	28,8	58,4	49,4	67,3	62	55,7	40,8	44,9	46,5	52,4	46	45,1	79,1	44,6
3	71,4	32,9	52,6	46,2	63	56,9	55	38,8	41,2	45,9	53,3	44,5	43	71,6	41,4
4	66,4	20	56,3	41,3	56,3	52,6	47,7	37,9	36,7	37,2	44,9	44,1	36,4	63,5	35,9
5	73,7	46,7	60	54,1	69,4	62,7	55	48,1	50,5	54,3	63,1	51	52,9	88,2	53
6	91,9	40,8	70	54	88,4	76,7	65,4	45,6	52,9	60,5	65,3	61,4	50,7	78,7	60,5
7	86,4	47,1	63,7	52,7	95,7	74,3	62,9	51,5	52,9	59,2	64	55,7	52,7	76,6	53
8	90,9	47,8	74,6	61,4	85,4	73,9	70,3	57	61,7	62,7	70,1	61,7	63,6	89	60,3
9	97,4	42	58,1	50,2	82,8	70,6	63	46,5	50,9	56,6	61	56,9	42,6	75,1	48,1
10	81,6	31,8	63,9	51,1	73,7	64,6	59,5	40,6	49,6	50,6	56	47,7	49,1	79,5	51,2
11	78,3	38,5	59,3	49,1	82,6	63,5	49,8	38,5	45,5	50,3	58,3	44,3	44,9	79,2	48
12	76,4	30,9	62,9	50,8	66,3	63,6	57,6	47,4	45,9	48,7	55,2	48,4	64,6	81,5	45,7
13	79,3	40,8	56,1	51,2	75,3	63,8	54,1	43,9	45,7	51,8	49,5	48,6	47,8	80,1	45,8
14	101,2	46,1	74,3	59,1	94,4	83,5	74,7	51,3	57,7	65,3	67,4	68,6	57,5	86,8	57,4
15	91,2	46,9	62,3	56,1	92,3	77,3	61,3	52,7	56	63,9	62,1	59,1	55	82,6	56,4
16	94,5	40,5	78,4	64,5	90,7	75	62,2	50,1	62,2	62,1	64,6	59,2	55,7	93,5	61
17	89,5	51,5	63,2	54,8	100,3	79,4	66,2	48,2	56,4	65,5	68,2	64,2	57,5	79	53,9
18	81,9	38,8	61,4	53,6	79,6	65,2	59,9	40,3	50,6	53,4	55,2	55,1	50,6	83,9	47,7

**Tabla 16.** Porcentajes de extracción promedio, mínimo y máximo para cada compuesto en estudio

HAP	Extracción Promedio [%]	Extracción Máxima [%]	Extracción Mínima [%]
Naftaleno	82,9	101,2	66,4
Pireno	38,8	51,5	20
I123cdP	63,3	78,4	52,6
DahA	53,2	64,5	41,3
Acenaftileno	78,8	100,3	56,3
Acenafteno	67,7	83,5	52,6
Fluoranteno	59,7	74,7	47,7
Criseno	45,5	57	37,9
BkF	50,8	62,2	36,7
Fenantreno	54	65,5	37,2
Antraceno	59,1	70,1	44,9
Fluoreno	53,5	68,6	44,1
BaP	51	64,6	36,4
BghiP	81,2	93,5	63,5

### 6.2.3. Optimización HLLE-HPLC-DAD

La etapa de optimización requiere contar con modelos que describan la respuesta más detalladamente que en el diseño experimental exploratorio (*screening*), y por esto es que la búsqueda de la superficie de respuesta requiere trabajar con más de 2 niveles por factor. La respuesta óptima D corresponderá a la máxima extracción de los 15 analitos simultáneamente, comprometiendo a las respuestas individuales de las mismas.

En la tabla 17 se muestran los volúmenes de cloroformo, metanol y de extracto y la concentración de NaCl correspondientes a cada experimento realizado, además se encuentra el valor D. En este caso se extendió el diseño especialmente respecto al volumen de cloroformo alcanzando a 120  $\mu$ L y el volumen de metanol a 1,50 mL. Los volúmenes de extracto obtenidos fueron bastante variables y fluctuaron entre 7 y 88  $\mu$ L. Los menores corresponden a

experimentos en que se utilizaron bajos volúmenes de cloroformo inicial y altos de metanol, teniendo en el experimento 8 el mínimo volumen. Al analizar esta respuesta no incluida en el diseño, sin embargo dependiente de las condiciones empleadas en cada experimento, no se encontró correlación con el valor D que representa la extracción simultánea de todos los compuestos.

La ecuación de regresión para la respuesta D que se ajustó a los datos, correspondiendo al modelo fue:

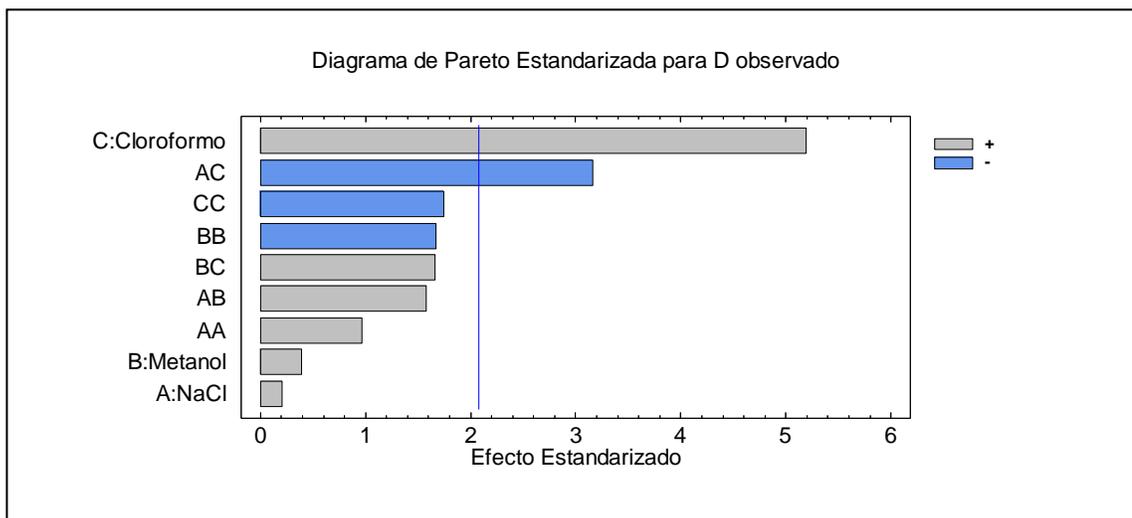
$$\begin{aligned}
 D_{\text{observado}} = & 0,6329 + 0,0065 \cdot NaCl + 0,0122 \cdot CH_3OH + 0,1612 \cdot CHCl_3 \\
 & + 0,0482 \cdot NaCl^2 + 0,0602 \cdot NaCl \cdot CH_3OH - 0,1204 \cdot NaCl \\
 & \cdot CHCl_3 - 0,0832 \cdot CH_3OH^2 + 0,0632 \cdot CH_3OH \cdot CHCl_3 \\
 & - 0,0869 \cdot CHCl_3^2
 \end{aligned}
 \tag{Ecuación 10}$$

En esta ecuación aparece un término constante y los coeficientes correspondientes a cada factor además de aquéllos que describen las interacciones de primer orden.

Los resultados del análisis de varianza demostraron que no hay carencia de ajuste, por lo que el modelo es adecuado para la descripción del sistema con un nivel de confianza del 95% ( $P=0,0942$ ). El modelo explica el 70 % de la variabilidad en el valor de D observado, apropiado para los fines de optimización. En la carta Pareto (figura 12) se observa, al igual que en el estudio exploratorio, la influencia positiva del volumen de cloroformo y como dato adicional el efecto negativo de la interacción cloroformo y concentración de NaCl, ambos estadísticamente significativos ( $P<0,05$ ).

**Tabla 17.** Matriz utilizada en diseño factorial a 3 niveles para los 3 factores estudiados decodificados, volumen de extracto y  $D_{\text{observado}}$  obtenidos en cada caso

N° de Experimento	Concentración de NaCl [%m/v]	Volumen de Metanol [mL ]	Volumen de cloroformo [μl]	Volumen de extracto [μl]	$D_{\text{observado}}$
1	12,5	1,2	90	50	0,29
2	10	0,9	60	26	0,17
3	12,5	0,9	60	29	0,51
4	15	0,9	60	33	0,40
5	10	1,2	60	20	0,34
6	12,5	1,2	60	19	0,52
7	15	1,2	60	20	0,62
8	10	1,5	60	7	0,10
9	12,5	1,5	60	11	0,08
10	15	1,5	60	15	0,50
11	12,5	1,2	90	47	0,64
12	10	0,9	90	50	0,78
13	12,5	0,9	90	56	0,48
14	15	0,9	90	60	0,44
15	10	1,2	90	49	0,65
16	12,5	1,2	90	47	0,73
17	15	1,2	90	53	0,72
18	10	1,5	90	38	0,71
19	12,5	1,5	90	44	0,52
20	15	1,5	90	50	0,73
21	12,5	1,2	90	54	0,73
22	10	0,9	120	86	0,68
23	12,5	0,9	120	88	0,75
24	15	0,9	120	87	0,40
25	10	1,2	120	70	0,84
26	12,5	1,2	120	74	0,65
27	15	1,2	120	74	0,66
28	10	1,5	120	69	0,78
29	12,5	1,5	120	73	0,72
30	15	1,5	120	68	0,69
31	12,5	1,2	90	50	0,59



**Figura 12.** Carta Pareto para respuesta única D observado, correspondiente a la función de conveniencia establecida para las múltiples respuestas.

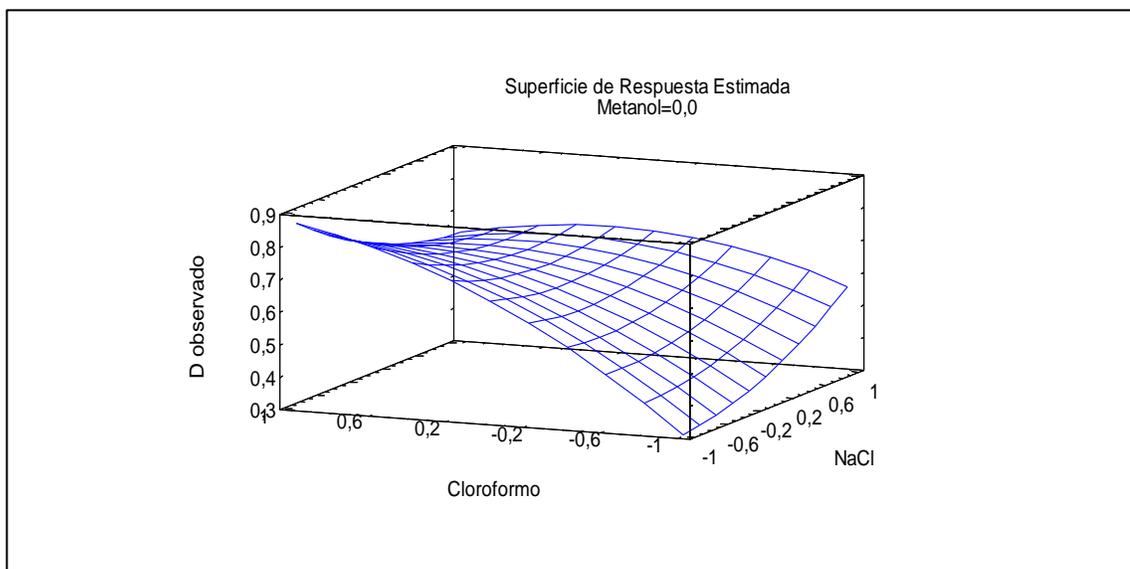
En la tabla 18 se presentan los porcentajes de extracción obtenidos en esta etapa, que en general son cercanos al 100% para cada HAP en algunos experimentos. Los mínimos de extracción estuvieron alrededor del 70% y los promedios de extracción cercanos al 87%.

Como se ha señalado anteriormente las técnicas de microextracción de HAPs para su optimización han sido estudiadas a través de diseños univariados y también en los últimos años se han abordado a través de diseños multivariados. Brum y col. [2008] plantean una estrategia de optimización multivariada para la extracción de estos compuestos en aguas contaminadas utilizando la metodología de superficie de respuesta basada en una matriz *Doehlert*. En el modelo utilizado se ajustaron los datos para tres factores y una respuesta experimental, correspondiente en cada caso a la eficiencia de extracción de cada analito. A partir de los resultados definieron puntos críticos considerados como los valores óptimos para cada factor, los que representarían el punto de la función donde la extracción de cada HAP es maximizada. Sin embargo las condiciones individuales conducían a la extracción parcial o total de otros HAPs. El método planteado no presenta así suficiente robustez para permitir la extracción cuantitativa de todos los compuestos de interés. A partir de las condiciones óptimas individuales y a través del análisis de componentes principales (PCA) se establecieron cuatro diferentes grupos de compuestos, que finalmente siguieron como tendencia de clasificación el peso molecular. De acuerdo a lo anterior se puede señalar que cada uno de estos grupos podría ser extraído

convenientemente por aplicación de condiciones experimentales muy específicas, lo que representa numerosos inconvenientes de tipo práctico.

Como se puede observar a partir de las tablas 17 y 18, la obtención del valor D permitió definir las condiciones óptimas a partir de porcentajes de extracción cuyos límites inferior y superior se encuentran en su mayoría entre un 70 y un 100%, es decir podría considerarse que dentro del dominio estudiado el método de extracción es de una gran robustez para la totalidad de las compuestos en estudio.

En el gráfico de superficie de respuesta obtenido en la optimización de la extracción de los 15 HAPs por HLLE (figura 13) se observa la influencia de la interacción entre los factores concentración de NaCl y volumen de cloroformo en el valor de D observado.

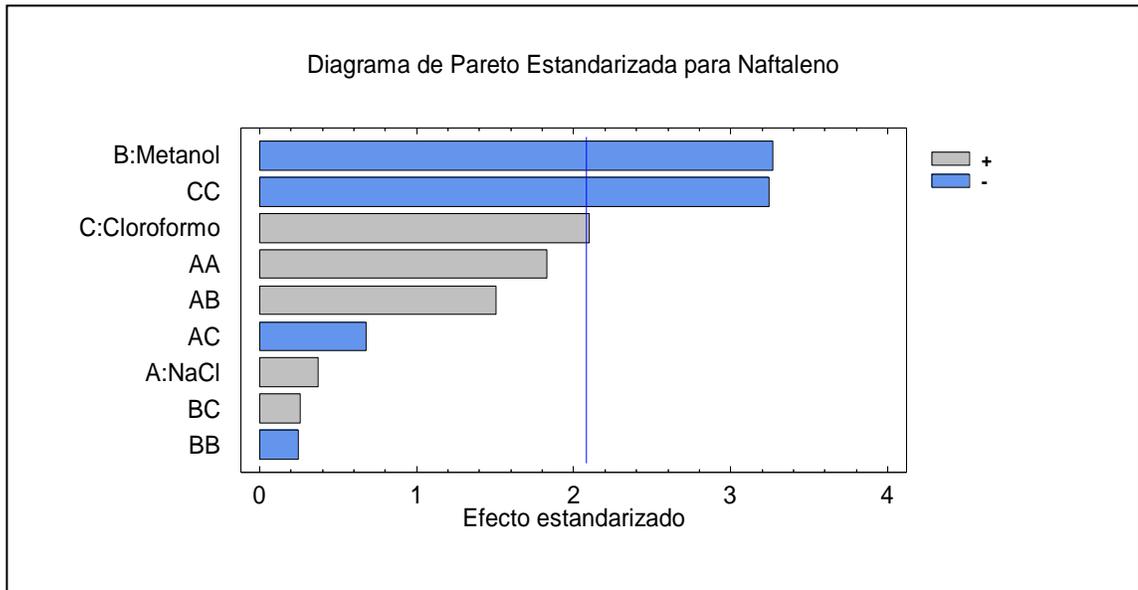


**Figura 13** Superficie de respuesta obtenida en la optimización de la extracción de 15 HAPs por HLLE.

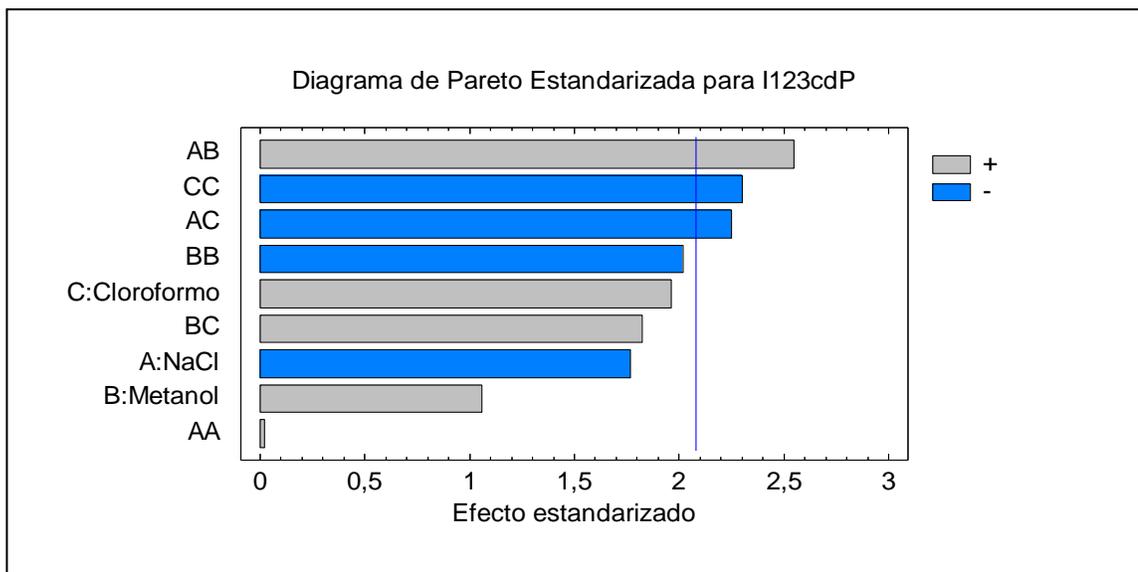
Al realizar el análisis individual para cada HAP, la interacción fue significativa especialmente para los compuestos de mayor peso molecular. Así, en la medida que aumenta la fuerza iónica, el efecto positivo de un mayor volumen de cloroformo se ve disminuido, situación que se da en un sentido inverso al utilizar volúmenes menores del solvente. Esta interacción no es posible describirla cuando se realiza el estudio univariado de los factores que influyen en un método analítico. Así, en el estudio de Tavakoli y col. [2008] se describe la disminución de las señales a una mayor concentración de NaCl solamente por un efecto de dilución debido a la

obtención de un mayor volumen de fase sedimentada (cloroformo). En este caso se puede señalar que el aumento de fuerza iónica a un mayor volumen de cloroformo no promueve el transporte de parte de los analitos hacia la fase orgánica como podría presumirse a partir del fundamento de la técnica de extracción y se desprende de estos resultados la necesidad de implementar la optimización considerando todos los componentes para la mejor comprensión del sistema.

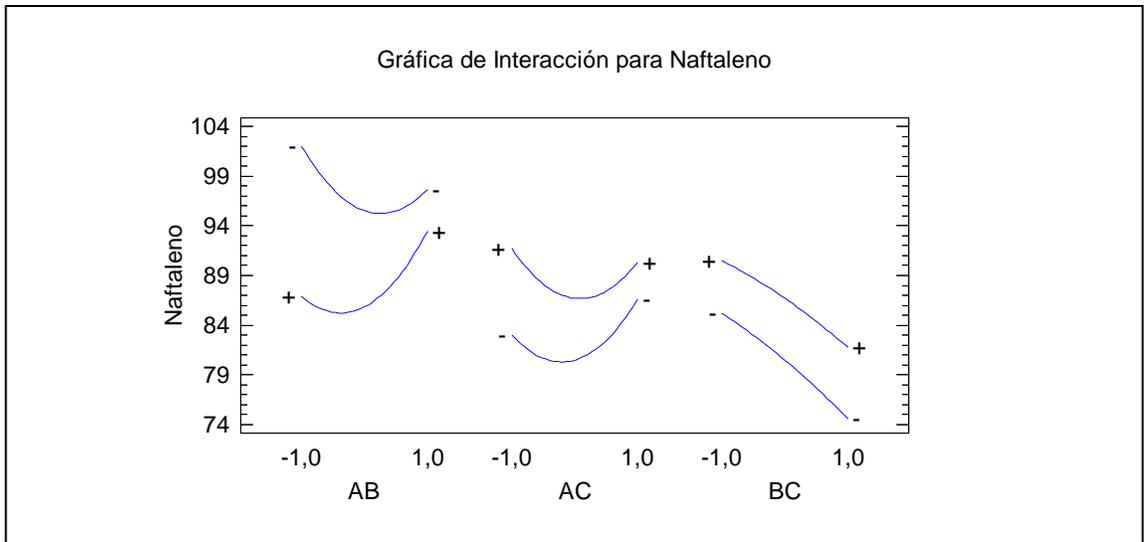
Del análisis de las respuestas obtenidas para cada compuesto se obtuvo el efecto significativo negativo del volumen de metanol solo en la extracción de naftaleno. En la figura 14 se encuentra la carta de Pareto para este compuesto. Aun cuando la interacción entre los volúmenes de metanol y de cloroformo no es significativa, en este caso también se observó el efecto significativo del solvente de extracción. Lo anterior puede explicarse sobre la base de la mayor polaridad de este hidrocarburo, modificándose la partición según el porcentaje de metanol en la extracción. Una situación diferente se produce para I123cdP (figura 15), compuesto representativo del grupo de menor polaridad, en donde la influencia individual de cada factor en el sistema no es significativa. En las figuras 16 y 17 se ilustran las interacciones para ambos compuestos, para el primero de ellos no significativas y para el segundo significativas en el caso del par cloruro de sodio-cloroformo y cloruro de sodio metanol



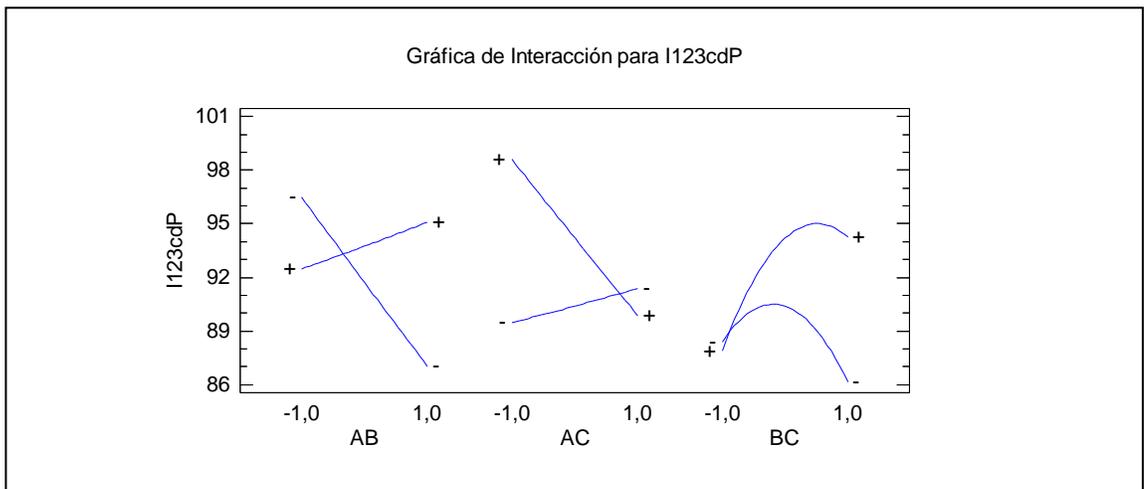
**Figura 14.** Carta Pareto para Naftaleno



**Figura 15.** Carta Pareto para Indeno[1,2,3-cd]pireno



**Figura 16.** Gráfico de Interacciones para Naftaleno



**Figura 17.** Gráfico de interacciones para Indeno[1,2,3-cd]pireno

**Tabla 18.** Porcentajes de extracción de cada compuesto en cada experimento de optimización del método HLLC-HPLC-DAD

N° Exp	Naftaleno	acenaftileno	Acenafteno	fluoranteno	Criseno	BbF	Pireno	BkF	Fenantreno	Antraceno	I123cdP	Fluoreno	BaP	DahA	BghiP
1	85,2	78,8	82,1	80,3	79,2	79,1	95,1	89,5	82,7	81,3	96,5	83,5	88,7	85,1	91,5
2	89,8	71,2	85,3	84,4	79,1	83,5	87,7	83,2	88	85	89,4	91,1	86,5	80,4	47,1
3	91	94,8	84,8	86,1	85,4	88,7	90,3	84,4	93	90,1	91,1	93,6	88,4	83,3	84,2
4	86,2	89,1	82,8	83,4	82,4	83	94,6	89,3	87,8	85,3	82,2	90,3	86,3	85,9	94,5
5	87,5	89,1	80,2	78,5	80,8	86,3	93	86,3	88,5	86,7	81,4	87,3	87,4	84	92,8
6	81,6	86,7	80,3	81,3	84,2	90,7	88,5	95,8	88,4	85,4	98,3	84,2	96,5	100,5	99,1
7	86,6	91,5	84,3	87,5	87	94,7	90,3	93,4	90,1	88,8	94,7	90,5	95,5	97,1	95,7
8	68,8	80,2	74,7	73,4	77,5	80,7	78,5	77,3	76,8	77,3	83,7	79,3	80	83,4	85,6
9	70,6	83,8	74,4	70,6	75,1	81,1	81,9	81,1	78,2	81,1	86,7	78,1	71,9	87,2	89,9
10	84,7	94,9	83,4	85,6	86,8	91,1	87,1	85,4	88,7	89,7	87,5	90,2	80	94,4	94,1
11	91,7	99,9	88,3	94,3	88	91,2	98,4	89,4	95,3	93,8	90,7	95,7	82,9	89	93,3
12	95,2	99,9	89,4	98,8	93,1	95,8	86,4	95,8	100,2	103,9	101,3	99,1	88,1	97,1	97,5
13	92,1	97,8	88,9	87,1	82,8	94,9	83,2	75,6	96,4	95,4	94,9	94,5	81,7	86,2	88,3
14	92,8	97,2	89,8	88,9	88,7	94,1	83,5	74,8	91,4	94,9	84,5	91,5	83,9	90,6	91,4
15	95	80,6	93,6	95,7	92,2	93,3	90,2	88,7	98,9	102,2	97,2	94,4	86,5	88,9	84,9
16	98,2	90,8	91,7	96,6	97,1	96,6	100,7	85,3	98,2	103,1	98,1	92,2	87,3	90,9	90,9
17	98,9	101	92,8	96,7	94,1	98,5	94,7	91,6	96,9	97,8	93,8	96,8	83,6	87,6	89,1
18	99,3	87,7	95	98,4	96,6	97,8	96,5	87,2	99,7	98,1	94,9	94,3	88,7	87,3	84,7
19	74,3	91,7	79,9	97,5	92,8	94,3	91,5	88,7	94,2	96,3	91,4	88,3	85,5	86,1	88
20	99,7	90	97,6	96,2	95,3	95,5	91,4	92,4	95,4	102,1	96,5	99,9	83,5	91,1	89,3
21	96	101,8	95,2	98,7	94,5	97,6	89,8	90,6	99,3	98,9	94,4	100,3	84,8	89,2	84,5
22	98,8	96	87,6	94,7	92,7	95	90,6	89	97,9	97,1	91,6	97,9	85,4	89,9	89,9
23	98,2	94,3	95,3	97,7	95,3	95	91,7	90,3	101,5	100,3	86,7	99	103,8	92,5	91,2
24	95,5	90,3	90,6	90,7	84,4	92,3	87,7	88	98,1	63,8	82,5	94,8	82,7	88,1	85,2
25	87,9	92	89,6	97,7	100,5	88,3	98,6	100,5	102,5	101,8	104	98,7	98,6	103,4	100,2
26	86,6	95,2	85,6	93,7	91,8	95,6	90	90,2	97,5	96,9	89,2	96,5	88,4	92,2	90,4
27	80,6	90,2	86,7	99,5	91,2	94,2	89,9	90,8	101,1	98,4	93,3	99,8	89	93	90
28	83,6	92	88,2	97,7	90,6	96,2	92,6	95,5	98,2	104,8	94,8	97,5	100	107,8	98,7
29	80,8	97,5	88	91,2	90,7	98,5	96,6	94,6	100,3	96,6	94,6	100,3	89,2	94,5	90,3
30	90,8	93,9	89,3	98,4	86,1	101,3	92,7	91	97,6	96,4	92,5	98,4	89,4	90,6	85,3
31	90,6	94,3	88,1	90,7	86,8	88,8	94,3	89,5	92	90,9	93,4	92,7	85,1	87,5	89,7

El valor de la respuesta en las condiciones que se establecieron como óptimas fue 0,870054. Estas condiciones corresponden a 120  $\mu$ L de cloroformo, 1,2 mL de metanol y 10% m/v para NaCl. En el experimento 25 encontramos dichas condiciones, aproximando el volumen ideal de metanol de 1,227 ml a 1,2 ml por factibilidad operacional. En la tabla 19 se resumen los niveles para los factores evaluados en la optimización que resultan en la respuesta D máxima.

**Tabla 19.** Resumen de los factores optimizados y codificados

<b>Factor</b>	<b>Nivel menor</b>	<b>Nivel mayor</b>	<b>Óptimo</b>
NaCl	-1,0	1,0	-1,0
CH <sub>3</sub> OH	-1,0	1,0	0,0914
Cloroformo	-1,0	1,0	1,0

Un mayor volumen de cloroformo será beneficioso para la extracción de los compuestos, ya que aumenta la cantidad de extractante disponible por molécula de HAP, sin embargo es importante considerar que el nivel superior fue seleccionado para favorecer la formación de la fase homogénea. La sal adicionada al sistema tiene la función de excluir el efecto de solvatación de las moléculas de metanol sobre el cloroformo, liberando al solvente extractante, sin embargo operacionalmente su disolución resulta complicada a cantidades mayores, dificultando la extracción de la fase sedimentada, por ello la obtención de un óptimo en el mínimo nivel empleado se debe considerar suficiente para permitir la separación de fases. Por su parte el nivel de metanol encontrado permite la formación de la fase homogénea inicial sin que se impida la posterior sedimentación al agregar el NaCl. En la tabla 20 se muestran los porcentajes mínimos, máximos y promedios resultantes de todos los experimentos realizados.

**Tabla 20.** Recuperaciones máximas y mínimas obtenidas para cada HAP en estudio en etapa de optimización.

HAP	% extracción mínimo	% extracción máximo	% extracción promedio
Naftaleno	68,8	99,7	89,0
Acenaftileno	71,2	101,8	91,4
Acenafteno	74,4	97,6	87,2
Fluoranteno	70,6	99,5	90,7
Criseno	75,1	100,5	88,5
BbF	79,1	101,3	92,1
Pireno	78,5	100,7	90,9
BkF	74,8	100,5	88,6
Fenantreno	76,8	102,5	94,0
Antraceno	63,8	104,8	93,0
I123cdP	81,4	104,0	92,0
Fluoreno	78,1	100,3	93,2
BaP	71,9	103,8	87,4
DahA	80,4	107,8	90,5
BghiP	47,1	100,2	89,3

Considerando los resultados del experimento N° 25, donde la concentración inicial era  $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada HAP en la solución acuosa inicial, se calculó el Factor de Enriquecimiento (FE), descrito en la tabla 21. El FE es la capacidad del método de extracción de concentrar los analitos de interés, considerando para ello las concentraciones iniciales en la solución acuosa y finales en el extracto sedimentado. Los factores de enriquecimiento son apropiados, aunque no superan los informados en la bibliografía [Tavakoli y col., 2008], sin embargo, son muy útiles para la finalidad de este trabajo, donde concentrar 40 veces aumenta las probabilidades de poder detectar y cuantificar en las muestras de hielo y nieve sobre las que será utilizada esta metodología. Los mayores FE superiores o iguales a 50 fueron para criseno, benzo[k]fluoranteno, fenantreno, antraceno, dibenzo [a,h] antraceno y benzo [g,h,i] perileno. El menor FE corresponde a naftaleno con 43.

**Tabla 21.** Concentraciones en extracto, porcentajes de recuperación y factores de enriquecimiento para cada HAP en estudio en etapa de optimización con condiciones óptimas.

<b>HAP</b>	<b>Concentración extracto [<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>]</b>	<b>Recuperación [%]</b>	<b>FE</b>
Naftaleno	2,196	87,9	43,9
Acenaftileno	2,301	92,0	46,0
Acenafteno	2,241	89,6	44,8
Fluoranteno	2,443	97,7	48,9
Criseno	2,511	100,5	50,2
BbF	2,207	88,3	44,1
Pireno	2,465	98,6	49,3
BkF	2,512	100,5	50,2
Fenantreno	2,563	102,5	51,3
Antraceno	2,545	101,8	50,9
I123cdP	2,599	104,0	52,0
Fluoreno	2,468	98,7	49,4
BaP	2,466	98,6	49,3
DahA	2,585	103,4	51,7
BghiP	2,505	100,2	50,1

#### **6.2.4. Parámetros de Calidad Analítica del Método HPLE-HPLC-DAD**

Las sensibilidad analítica para cada compuesto en estudio, mostrada en la tabla 22, fue mayor para naftaleno y acenaftileno y menor para fluoreno y benzo[g,h,i]perileno.

Los coeficientes de determinación se encuentran entre 0,9903 y 0,9998, siendo indicativo de que la variabilidad de los datos son explicados por el modelo lineal seleccionado sobre el 99 % para todos los compuestos.

En la tabla 23 se muestran los límites de detección y cuantificación obtenidos de acuerdo al procesamiento estadístico de los datos y por comparación directa de la señal contra ruido en la medición, lo que lleva a que se observen diferencias notables en algunos compuestos entre los LD, tales como es el caso de benzo[g,h,i]perileno, pireno y dibenzo[a,h]antraceno, donde se obtuvieron LD experimentales de 0,5117, 0,3526 y 0,4124 ng mL<sup>-1</sup> respectivamente, contra los LD estadísticos de 4,1507, 2,3679 y 2,8994 ng mL<sup>-1</sup>. Los valores obtenidos de acuerdo al procedimiento estadístico, en general, son sobrevalorados, ya que contemplan el error estándar de la regresión, que comprende errores aleatorios provenientes de al menos cuatro patrones de calibración.

**Tabla 22.** Parámetros de calidad analítica del método de HLLC-HPLC-DAD.

<b>HAP</b>	<b>a</b>	<b>S<sub>a</sub></b>	<b>B</b>	<b>S<sub>b</sub></b>	<b>S<sub>R/c</sub></b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>(1- S<sub>b</sub>/b)</b>	<b>S</b> <b>[µg mL<sup>-1</sup>]</b>
Naftaleno	-8787	1454	6269515	54861	1885	0,9998	0,9912	0,0003
Acenaftileno	-233	541	1213822	20417	701	0,9988	0,9832	0,0006
Acenafteno	1196	2456	2529728	92651	3184	0,9960	0,9634	0,0013
Fluoranteno	445	431	1241965	16271	559	0,9994	0,9869	0,0005
Criseno	-1597	973	1353240	36700	1261	0,9978	0,9729	0,0009
BbF	-6520	1646	2305597	62099	2134	0,9978	0,9731	0,0009
Pireno	2391	2145	3051767	80928	2781	0,9979	0,9735	0,0009
BkF	-1556	1528	2806534	57628	1980	0,9987	0,9795	0,0007
Fenantreno	-1418	1771	2252721	66816	2296	0,9974	0,9703	0,0010
Antraceno	-8	2817	8445723	106272	3652	0,9995	0,9874	0,0004
I123cdP	-4782	1709	1977831	64459	2215	0,9968	0,9674	0,0011
Fluoreno	1001	1430	942171	53951	1854	0,9903	0,9427	0,0020
BaP	-1420	1135	1987197	42801	1471	0,9986	0,9785	0,0007
DahA	-2815	2192	2546003	82670	2841	0,9968	0,9675	0,0011
BghiP	-1365	1586	1287151	59832	2056	0,9936	0,9535	0,0016

**Tabla 23.** Límites de detección y de cuantificación obtenidos estadísticamente (estad) y experimentalmente (exp).

HAP	LD exp [ng mL <sup>-1</sup> ]	LC exp [ng mL <sup>-1</sup> ]	LD estad [ng mL <sup>-1</sup> ]	LC estad [ng mL <sup>-1</sup> ]
Naftaleno	0,3580	1,1940	0,7814	2,6045
Acenaftileno	1,8153	6,0511	1,5019	5,0064
Acenafteno	0,7189	2,3962	3,2703	10,9011
Fluoranteno	1,2102	4,0340	1,1698	3,8993
Criseno	1,0907	3,6357	2,4216	8,0720
BbF	1,0305	3,4351	2,4050	8,0167
Pireno	0,3526	1,1752	2,3679	7,8930
BkF	0,4944	1,6480	1,8335	6,1116
Fenantreno	0,4457	1,4855	2,6484	8,8280
Antraceno	0,3040	1,0133	1,1236	3,7452
I123cdP	0,8937	2,9790	2,9101	9,7003
Fluoreno	1,5052	5,0174	5,1131	17,0436
BaP	1,4401	4,8003	1,9232	6,4107
DahA	0,4124	1,3748	2,8994	9,6645
BghiP	0,5117	1,7055	4,1507	13,8356

Finalmente en la tabla 24 se muestran los resultados de las pruebas de recuperación, obteniéndose entre 67,4 y 93,5 % para BbF y acenafteno respectivamente al emplear una solución de 20 ng mL<sup>-1</sup>. La precisión resultante obtenida a partir de cinco muestras alcanzó valores entre 0,7 y 4,7 % los cuales deben considerarse como muy apropiados si se tiene en cuenta el importante número de compuestos a determinar simultáneamente y los niveles de concentración en que originalmente se encuentran. Los factores de enriquecimiento en este caso fluctuaron entre 31 y 43. Estos resultados indican que el método cumple con las características deseables de pre-concentración y recuperación de los compuestos de interés desde soluciones acuosas diluidas. Sin embargo, si se compara con los valores de recuperación obtenidos en los experimentos de optimización (tabla 21) se puede observar una disminución de los mismos, lo que puede ser atribuido a que en este caso se trabajó con valores cercanos a algunos límites de cuantificación, aunque no es una tendencia general. En consecuencia y debido al objetivo del análisis de muestras que presumiblemente presentarían niveles aun mas bajos que los obtenidos al utilizar como medio de detección DAD, se implementó la metodología utilizando fluorescencia en la detección con lo cual se optimizarían los límites de detección y cuantificación instrumentales, previo al análisis de las muestras del testigo de hielo de Antártica.

**Tabla 24.** Porcentajes de recuperación de cada compuesto, desviación estándar relativa y factor de enriquecimiento correspondiente.

<b>HAP</b>	<b>% E</b>	<b>DER [%]</b>	<b>FE</b>
Naftaleno	87,4	1,2	41
Acenaftileno	81,1	4,7	32
Acenafteno	93,5	0,7	43
Fluoranteno	81,3	3,4	38
Criseno	72,4	5,1	34
BbF	67,4	4,2	31
Pireno	81,9	2,6	38
BkF	76,0	3,8	35
Fenantreno	87,9	2,5	41
Antraceno	91,6	1,8	43
I123cdP	74,8	4,2	35
Fluoreno	90,3	3,9	42
BaP	74,1	3,8	34
DahA	79,8	4,7	37
BghiP	71,3	3,4	33

### **6.3. Método Cromatográfico HPLC-FLD**

#### **6.3.1. HPLC-FLD**

A fin de contar con una mayor sensibilidad instrumental se optimizó un programa de elución en gradiente para los compuestos estudiados inicialmente y 2 adicionales (BaA y coroneno) por medio de HPLC-FLD. Dentro de las consideraciones para utilizar este método cromatográfico está la imposibilidad de determinar todos los compuestos, ya que por ejemplo acenaftileno no es detectable por fluorescencia.

En esta etapa del trabajo fue necesario realizar el remplazo de la columna utilizada porque se observó pérdida de resolución en la separación de los compuestos. Aun cuando ambas eran columnas poliméricas C18 destinadas específicamente a la separación de HAPs, diferían en el largo (150 mm la primera y 250 mm la segunda) y en el espesor de film (3 y 5  $\mu\text{m}$ ) proporcionando una eficiencia diferente. Lo anterior implicó optimizar la separación cromatográfica y determinar los tiempos de retención asociados a los compuestos.

Adicionalmente, se comenzó a trabajar con coroneno y BaA, que fueron incluidos en la mezcla de compuestos analizados. El programa en gradiente desarrollado en esta etapa es el señalado en la tabla 25.

**Tabla 25.** Programa de elución en gradiente para la columna Inertsil ODS-P

<b>Tiempo [min]</b>	<b>Acetonitrilo [%]</b>	<b>Agua [%]</b>
0-15	90	10
15-32	100	0
32-35	70	30
35-40	90	10

Se determinaron los nuevos tiempos de retención correspondientes a cada HAP utilizando HPLC-DAD. Los patrones inyectados correspondieron a una solución con concentraciones alrededor del límite de cuantificación ( $4 \text{ ng mL}^{-1}$  en acetonitrilo: cloroformo 1:1). Con la obtención de los espectros y cromatogramas, se realizó el respectivo contraste espectral y asociación de los tiempos de retención con cada compuesto. Posteriormente se trabajó sólo con el detector de fluorescencia por el orden de las concentraciones a determinar, por debajo de los LD y LC obtenidos para el proceso HPLC-DAD. La identificación inequívoca fue posible al disponer de ambos detectores, DAD y FLD, en el mismo equipo de trabajo, resultando complementaria la información obtenida en estas condiciones.

En la tabla 26 se muestran los tiempos de retención obtenidos y los respectivos pares de longitudes de onda para realizar la medición de cada compuesto. Los pares de longitudes de onda para la excitación y emisión de cada compuesto fueron seleccionados a partir de los trabajos de Bourdat-Deschamps y col. [2007], Capelo y col. [2005] y Prieto –Blanco y col. [2010], además de las pruebas experimentales realizadas con la mezcla de HAPs. La posibilidad instrumental de someter al proceso de excitación y emisión recogiendo los datos en cuatro canales para cada multi-estándar, permitió agrupar los compuestos de acuerdo a la mayor sensibilidad y la determinación simultánea de todos ellos.

**Tabla 26.** Tiempos de retención y longitudes de onda de excitación y de emisión para la cuantificación de HAPs mediante HPLC-FLD

HAP	Tiempo de retención [min]	$\lambda$ excitación [nm]	$\lambda$ emisión [nm]
Naftaleno	5,314	220	330
Acenafteno+ Fluoreno	7,478	220	330
Fenantreno	8,316	250	375
Antraceno	9,206	250	375
Fluoranteno	10,305	300	500
Pireno	11,275	250	375
BaA	13,671	292	410
Criseno	14,259	250	375
BbF	16,801	292	410
BkF	17,906	292	410
BaP	19,663	292	410
DahA	21,772	292	410
BghiP	24,056	292	410
I123cdP	24,674	300	500
Coroneno	32,808	300	500

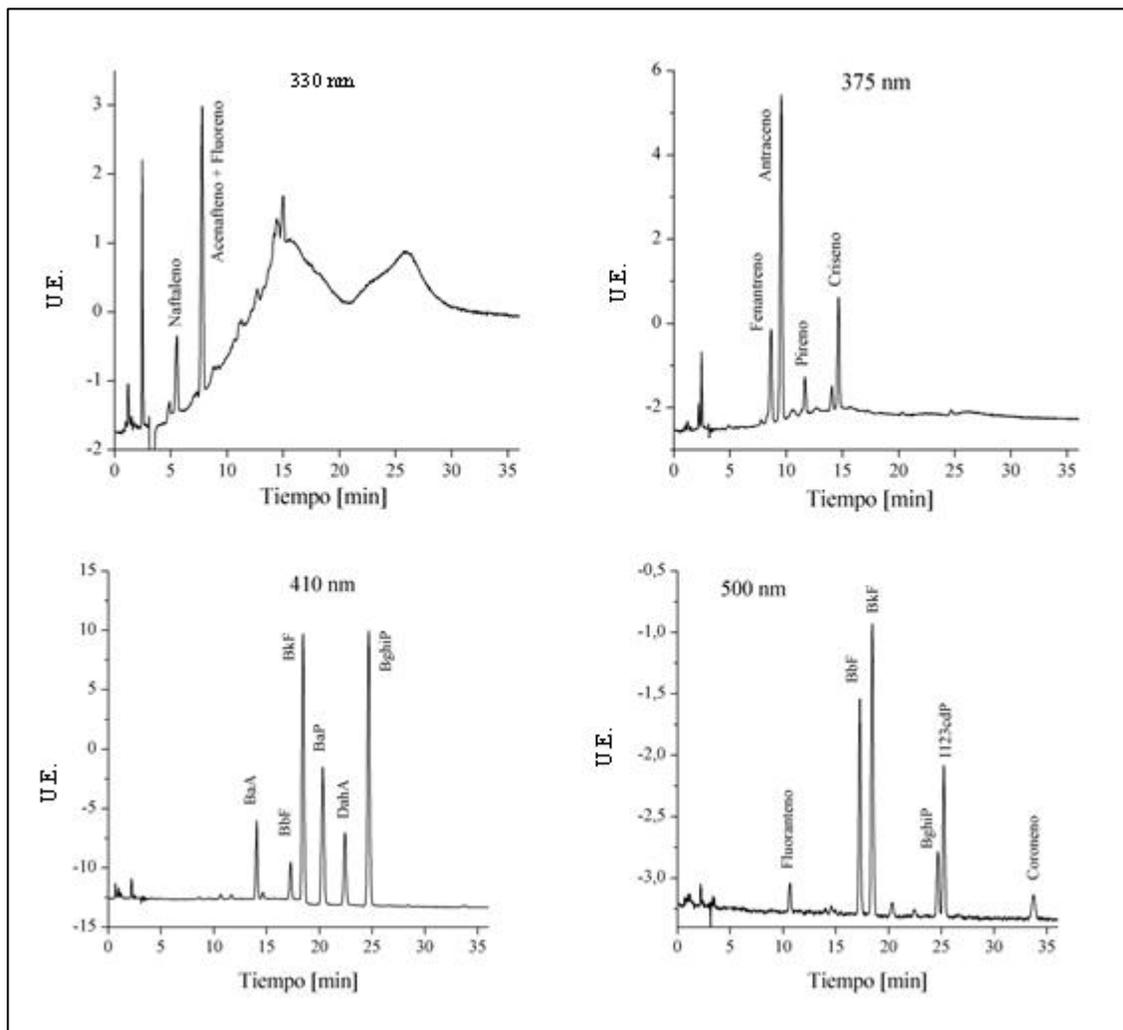
La separación de benzo[b] fluoranteno y benzo[k]fluoranteno, que tienen características de  $M$ ,  $K_{OW}$  y solubilidad en agua similares fue posible, a pesar que fueron estudiados con los mismos pares de longitudes de onda. No fue posible resolver adecuadamente la separación de acenafteno y fluoreno, siendo dichos compuestos descartados para los fines de este trabajo de tesis. Esta situación ha sido descrita anteriormente al utilizar otras columnas específicas para la separación de HAPs [Capelo y col., 2005]. Prieto-Blanco y col. [2010] han informado la posibilidad de lograr la separación de fluoreno y acenafteno con fase móvil agua:acetonitrilo (20:80) y agua:metanol (25:70) utilizando una columna de octadecil sílica (fase reversa) con tamaño de partícula de 3,5  $\mu$ m (150 mm\*3,0 mm), sin embargo con problemas para separaciones de otros pares, tal como el caso de BaA y criseno.

La separación de los demás compuestos se obtuvo con una adecuada resolución en un tiempo total de 40 minutos, incluido el re-equilibrio de la columna.

La eficiencia de la columna en la separación en gradiente de cada HAP varió entre 2,824 platos teóricos (N) para naftaleno, el compuesto menos retenido y 25,180 para coroneno, el

compuesto mas retenido. Los valores de resolución fluctuaron entre 0,8 y 6,9. El primero corresponde a la separación de fenantreno-antraceno, sin embargo a través de las herramientas de integración del software, a pesar del leve solapamiento de las señales, fue posible su correcta integración.

En la figura 18 Se observan cromatogramas tipo para esta separación de acuerdo a los 4 canales de pares de longitudes de onda excitación/emisión utilizados.



**Figura 18.** Cromatogramas para multiestándar de 2,6 ng mL<sup>-1</sup> a las longitudes de onda de emisión correspondientes a los diferentes compuestos

### 6.3.2. Parámetros de Calidad Analítica del Método Cromatográfico HPLC-FLD

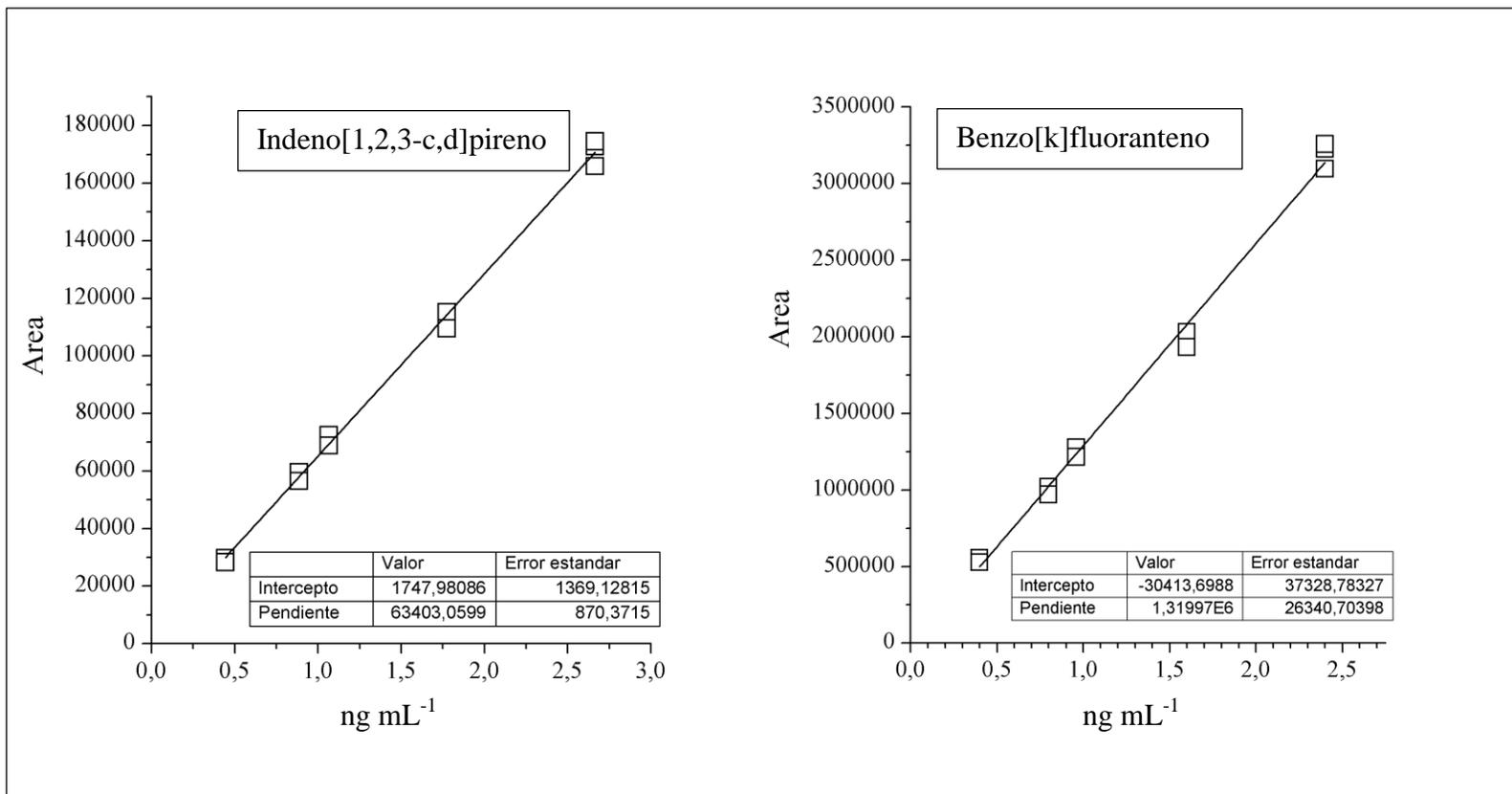
En la tabla 27 se presentan los límites de detección y cuantificación instrumentales obtenidos, cuyos valores varían desde 0,0825/0,2772 (LD/LC) para antraceno hasta 0,1696/0,5652 ng mL<sup>-1</sup> para fluoranteno. Considerando que para HPLC-DAD se habían obtenido valores entre 1,7/5,6 y 21,3/71,3 ng mL<sup>-1</sup> se puede establecer que la determinación por HPLC-FLD resulta apropiada para el estudio de estos compuestos en las muestras de testigo de hielo, alcanzándose valores para el LD del orden de los pg mL<sup>-1</sup>.

Las sensibilidades analíticas fueron menos adecuadas para fluoranteno, en contraste con las obtenidas para antraceno. El intervalo fue escogido en función de los estudios posteriores para establecer la linealidad de la metodología analítica comprendida en la extracción. En otros métodos basados en la determinación por fluorescencia se han utilizado intervalos más amplios [0,5-15 ng mL<sup>-1</sup>, Brum y col., 2008] obteniéndose una buena relación entre las concentraciones e intensidad de la fluorescencia. Para el intervalo empleado en este trabajo los coeficientes de determinación variaron entre 0,9942 y 0,9984, siendo indicativo de que la variabilidad de los datos son explicados por el modelo lineal seleccionado sobre el 99 % para todos los compuestos.

En la figura 19 se ilustran los resultados de linealidad obtenidos para I123cdP y BkF en el intervalo de concentraciones de 0,2 a 2,6 ng mL<sup>-1</sup>.

**Tabla 27.** Parámetros de la ecuación de regresión para la calibración, sensibilidad analítica, límites de detección y cuantificación para la determinación de HAPs mediante HPLC-FLD (0,2 hasta 2,6 ng mL<sup>-1</sup> en acetonitrilo: cloroformo =1:1).

HAP	a	S <sub>a</sub>	b	S <sub>b</sub>	S <sub>R/c</sub>	R <sup>2</sup>	(1- S <sub>b</sub> /b)	S [ng mL <sup>-1</sup> ]	LD [ng mL <sup>-1</sup> ]	LC [ng mL <sup>-1</sup> ]
Naftaleno	-4891	1411	50928	737	2700	0,9970	0,9855	0,0530	0,1500	0,4999
Fenantreno	-21041	3559	121841	2183	6272	0,9964	0,9821	0,0515	0,1430	0,4766
Antraceno	3667	6484	425373	4530	12411	0,9984	0,9893	0,0292	0,0825	0,2772
Fluoranteno	571	572	20115	398	1206	0,9945	0,9802	0,0600	0,1696	0,5652
Pireno	5303	1168	35287	708	1622	0,9960	0,9799	0,0460	0,1277	0,4256
BaA	1787	6775	325608	4687	12967	0,9971	0,9856	0,0398	0,1126	0,3783
Criseno	-103667	6825	294190	4586	13062	0,9961	0,9844	0,0444	0,1256	0,4186
BkF	-30414	37329	1319970	26341	71448	0,9945	0,9800	0,0541	0,1531	0,5103
BbF	-5547	3265	168170	2153	6250	0,9977	0,9872	0,0372	0,1051	0,3504
BaP	-47	16118	774256	11150	30850	0,9971	0,9856	0,0398	0,1127	0,3757
DahA	16390	9018	378711	6105	17598	0,9964	0,9839	0,0465	0,1314	0,4381
BghiP	6135	30387	1449700	20124	53548	0,9979	0,9861	0,0369	0,1026	0,3420
I123cdP	1748	1369	63403	870	2621	0,9974	0,9863	0,0413	0,1169	0,3897
Coroneno	-6463	544	20812	478	788	0,9942	0,9770	0,0378	0,1051	0,3504



**Figura 19.** Curvas de calibración para Indeno[1,2,3-c,d]pireno y Benzo[k]fluoranteno utilizadas para determinación de parámetros de la ecuación de regresión para la calibración, sensibilidad analítica, límites de detección y cuantificación. (0,2 hasta 2,6 ng mL<sup>-1</sup>).

#### 6.4. HLLE-HPLC-FLD

La sensibilidad analítica, límites de detección y cuantificación obtenidos para la metodología de extracción y cuantificación desarrollada varían entre 0,0078/0,0203/0,0676 (S/LD/LC para fluoranteno) y 0,0006/0,0015/ 0,0051 (para antraceno) ng mL<sup>-1</sup>.

Los coeficientes de determinación se encuentran entre 0,9654 para fluoranteno y 0,9998 para antraceno (tabla 28).

Si se consideran los órdenes de los valores de concentración de cada HAP en estudio (0,03-0,11 ng mL<sup>-1</sup> en la muestra acuosa) y los porcentajes de recuperación anteriormente obtenidos a mayores niveles de concentración (HPLC-DAD) se debe destacar que los parámetros de calidad analítica del método resultan absolutamente apropiados para la determinación cuantitativa de cada uno de los compuestos en las muestras objeto de estudio, tanto por la linealidad como por los LDs y LCs obtenidos.

Otros autores han empleado para estudios de linealidad de métodos de microextracción intervalos de concentración similares, por ejemplo Bourdat-Deschamps y col. [2007] utilizan entre 0,002 y 0,100 ng mL<sup>-1</sup> también considerando los niveles de concentración esperados en este caso en agua de lluvia.

En la tabla 29 se muestran las concentraciones iniciales de las muestras fortificadas ( $C_i$ ). Se indican además los respectivos promedios de las concentraciones equivalentes a las extraídas después de aplicar el método HLLE en cada muestra de 3,5 mL ( $C_{eq}$ ). Este valor se obtuvo teniendo en cuenta en cada caso el volumen final del extracto en cloroformo y su dilución con acetonitrilo. A partir de estos valores se obtuvieron los porcentajes de recuperación del método a un nivel de concentración inicial del orden de 0,1 ng mL<sup>-1</sup> para cada HAP. Los valores calculados fueron superiores al 70% para todos los compuestos, siendo superior al 84% en la mayoría de los casos y con un promedio de 89%. También se muestran los valores de desviación estándar relativa obtenida para la determinación en triplicado de cada compuesto (DER, %). Estos fluctuaron entre 1,1 (BbF) y 6,5 % (fluoranteno), exceptuando coroneno y BghiP con un 7,0 y 9,9 %, respectivamente.

En la tabla 29 también se encuentran las concentraciones de los extractos en cloroformo ( $C_{ex}$ ) y los respectivos factores de enriquecimiento (FE). Estos últimos indican que el método de pre-concentración es altamente eficiente en todos los casos, presentando valores entre 34 y 56 para BaP y BghiP, respectivamente.

En cuanto a la detección y cuantificación de HAPs con detección por fluorescencia, utilizando la micro-extracción dispersiva líquido-líquido (DLLE), Rezaee y col. [2010] señalan factores de enriquecimiento entre 296 y 462, LD entre 10 y 1  $ng\ mL^{-1}$  en muestras acuosas y jugo de frutas, extraídas con 16  $\mu L$  de  $C_2H_2Cl_4$  dispersado en 1 mL de acetonitrilo y LC entre 7 y 0,1  $ng\ mL^{-1}$  en muestras acuosas extraídas con 50  $\mu L$  de  $[C_8MiM][PF_6]$  dispersado en 1 mL de acetona.

En otro trabajo, Leong y col. [2010] realizaron la extracción de 16 HAPs a través de DLLE con diferentes halosolventes desde muestras acuosas. Considerando que dicha metodología incluye un sistema similar al utilizado, estudiaron el efecto del tipo de solvente extractante señalando que algunos clorosolventes como el cloroformo son adecuados para realizar este tipo de extracción desde muestras acuosas diluidas. Los LDs informados en general son del orden de décimas de  $ng\ mL^{-1}$ ; comparativamente y teniendo en cuenta que el método DLLE está basado en el mismo principio de extracción y que la determinación de los analitos en dicho trabajo fue por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se puede decir que los resultados obtenidos por HPLC-FLD son muy superiores. Aun cuando los FE sean superiores a los obtenidos en el presente estudio, se debe considerar que el método fue optimizado en función de obtener un volumen de extracto suficiente para ser medido por HPLC.

Para otras técnicas de microextracción basadas en otros principios como es el caso de *Stir Bar Sorptive Extraction* (SBSE) con determinación por HPLC-FLD, Bourdat-Deschamps y col. [2007] presentan en las condiciones óptimas de aplicación recuperaciones cuantitativas solo al nivel superior empleado (0,050  $ng\ mL^{-1}$ ) alcanzando valores de un 87%, en cambio para niveles menores (0,005  $ng\ mL^{-1}$ ) las recuperaciones son variables y menores (60-87%). La repetibilidad obtenida a los más bajos niveles alcanzó a un 12,5 % (DER). El método fue dependiente del volumen de muestra y se definió como condición óptima el uso de 10 mL con una doble extracción con acetonitrilo. Se aplicó esta metodología exitosamente en la determinación de HAPs en muestras de agua de lluvia, sin embargo el tiempo implicado en el procedimiento fue al menos de 2 horas. En este caso los LD fueron inferiores variando entre 0,0002 y 0,0015  $ng\ mL^{-1}$ .

También se han calculado LDs y LCs para técnicas que utilizan volúmenes de muestra considerablemente mayores (300 mL, Brum y col., 2008) alcanzándose valores de LD inferiores, aproximadamente un orden de magnitud menores que los mencionados anteriormente.

Por último, Tavakoli y col. [2008] aplicando el método de HLLC utilizando GC-FID alcanzan valores de LD entre 0,20 y 0,18 ng mL<sup>-1</sup> en las condiciones óptimas de extracción, definidas usando diseños univariados, muy por encima de los obtenidos en el presente trabajo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el método desarrollado cumple con los objetivos propuestos de extraer y cuantificar los HAPs con una adecuada precisión y exactitud en las muestras de testigo de hielo que presenten concentraciones ultratraza de los HAPs en estudio.

**Tabla 28.** Parámetros de la ecuación de regresión para la calibración, sensibilidad analítica, límites de detección y cuantificación para la determinación de HAPs mediante HLLC-HPLC-FLD (entre 0,03 y 0,11 ng mL<sup>-1</sup> en muestra acuosa)

HAP	a	S <sub>a</sub>	b	S <sub>b</sub>	S <sub>R/c</sub>	R <sup>2</sup>	(1- S <sub>b</sub> /b)	S [ng mL <sup>-1</sup> ]	LD [ng mL <sup>-1</sup> ]	LC [ng mL <sup>-1</sup> ]
Naftaleno	-6346	12530	1368643	136727	9339	0,9854	0,9001	0,0068	0,0177	0,0591
Fenantreno	70722	11327	2409954	154507	8443	0,9878	0,9359	0,0035	0,0091	0,0303
Antraceno	92342	7758	9992628	118952	5859	0,9998	0,9881	0,0006	0,0015	0,0051
Fluoranteno	10278	7221	430056	82182	3355	0,9654	0,8089	0,0078	0,0203	0,0676
Pireno	-25581	5418	1827415	84102	3016	0,9968	0,9540	0,0017	0,0043	0,0143
BaA	-8362	14222	7434518	205396	10600	0,9977	0,9724	0,0014	0,0037	0,0123
Criseno	19802	5562	3035704	78040	4146	0,9980	0,9743	0,0014	0,0035	0,0118
BbF	574	7830	1177225	113455	5746	0,9818	0,9036	0,0049	0,0127	0,0423
BkF	1819	87361	44872216	1286947	112782	0,9894	0,9713	0,0025	0,0065	0,0218
BaP	70686	28726	12999072	414875	21411	0,9970	0,9681	0,0016	0,0043	0,0143
DahA	916	11179	12789735	164680	14432	0,9978	0,9871	0,0011	0,0029	0,0098
BghiP	551	8006	7696498	117942	10336	0,9970	0,9847	0,0013	0,0035	0,0116
I123cdP	16162	2414	1474262	28540	2502	0,9994	0,9806	0,0017	0,0044	0,0147
Coroneno	-6874	648	534548	9484	514	0,9995	0,9823	0,0010	0,0025	0,0083

**Tabla 29.** Porcentajes de Recuperación, desviación estándar y factor de enriquecimiento (FE) para la determinación de HAPS mediante HPLE-HPLC-FLD

<b>HAP</b>	<b>C<sub>i</sub></b> <b>[ng mL<sup>-1</sup>]</b>	<b>C<sub>eq</sub></b> <b>[ng mL<sup>-1</sup>]</b>	<b>DER</b> <b>[%]</b>	<b>Recuperación</b> <b>[%]</b>	<b>C<sub>ex</sub>*</b> <b>[ng mL<sup>-1</sup>]</b>	<b>FE</b>
Naftaleno	0,1296	0,1256	3,0	97	5,8535	45
Fenantreno	0,1037	0,1014	2,0	98	5,0102	48
Antraceno	0,0970	0,0950	4,0	98	4,4317	46
Fluoranteno	0,0979	0,0965	6,5	99	4,7645	49
Pireno	0,1008	0,0845	2,7	84	3,9426	39
BaA	0,0979	0,0869	3,2	89	3,7271	38
Criseno	0,1008	0,0994	2,4	99	4,6498	46
BkF	0,0480	0,0428	6,3	89	1,8923	39
BbF	0,1027	0,1016	1,1	99	3,8700	38
BaP	0,0979	0,0709	2,4	72	3,2979	34
DahA	0,0800	0,0760	5,3	95	3,6601	46
BghiP	0,0960	0,0801	9,9	83	5,3342	56
I123cdP	0,0888	0,0689	2,0	78	3,1690	36
Coroneno	0,1056	0,0755	7,0	71	3,6483	35

\*C<sub>ex</sub>: concentración del extracto previo a dilución con acetonitrilo.

## 6.5. Análisis de Muestras

La aplicación de la metodología desarrollada HPLE-HPLC-FLD en las muestras del testigo de hielo IC-5 fue exitosa considerando las bajas concentraciones y pequeños volúmenes de muestra disponibles.

Las curvas de calibración (tabla 30) resultaron tener buenos valores de  $R^2$  para cada HAP; dichos valores se encuentran entre 0,9945 y 0,9984 para fluoranteno y antraceno respectivamente.

Los resultados obtenidos (tabla 31) para cada muestra incluyen las concentraciones encontradas para cada compuesto en estudio y la relación entre el volumen de muestra y el volumen de extracto obtenido; esta última relación corrobora la posibilidad de concentrar los analitos en un volumen de fase sedimentada mucho menor que el inicial, con valores entre 47 y 56, a lo que se suman los altos valores de extracción obtenidos en la sección anterior de este trabajo.

Existen antecedentes de estos compuestos en diferentes matrices y sectores de Antártica, por lo que se esperaba encontrarlos en las muestras de testigos de hielo IC-5 (82°30'30,8" S y 79°28'02,7" O). Así, la presencia de algunos compuestos fue detectada y en algunos casos también el método permitió su cuantificación. La utilización de blancos analíticos que no muestran señales correspondientes a los analitos y la ausencia de algunos compuestos permiten aseverar que hay ausencia de contaminación de las muestras y de los extractos en el trabajo en el laboratorio y manipulación asociada. Ejemplo de ello es la no detección de coroneno y BaA en ninguna muestra, en contraste criseno y I123cdP fueron detectados y cuantificados en todas las muestras. En el caso de naftaleno los valores más altos se encontraron para las muestras M41-50 y M81-90 y fueron de 0,136 y 0,231  $\text{ng mL}^{-1}$ , muy por sobre el valor del correspondiente LC (0,0591  $\text{ng mL}^{-1}$ ). Las concentraciones encontradas para I123cdP varían entre 0,020 (cercano al LC) y 0,147  $\text{ng mL}^{-1}$  para las muestras M31-40 y M72-80, indicando gran diferencia en la presencia de dicho HAP en las muestras analizadas. Fueron detectados, pero no cuantificados BbF y BkF en la mayoría de las muestras, no obstante, las señales encontradas indican concentraciones cercanas al LC respectivo.

**Tabla 30.** Curvas de calibración utilizadas para cada compuesto en estudio ( $y = \text{área}$  y  $x = \text{concentración ng mL}^{-1}$ ).

HAP	Ecuación	R <sup>2</sup>
Naftaleno	$y = 50459x - 4890$	0,9970
Fenantreno	$y = 121841x - 21041$	0,9964
Antraceno	$y = 425373x + 3667$	0,9984
Fluoranteno	$y = 20115x + 571$	0,9945
Pireno	$y = 35288x + 5301$	0,9960
BaA	$y = 325608x + 1786$	0,9971
Criseno	$y = 294190x - 103667$	0,9961
BbF	$y = 1E+06x - 30414$	0,9945
BkF	$y = 168171x - 5547$	0,9977
BaP	$y = 774256x - 47$	0,9971
DahA	$y = 378711x + 16390$	0,9964
BghiP	$y = 1E+06x + 6135$	0,9979
I123cdP	$y = 63403x + 1748$	0,9974
Coroneno	$y = 20812x - 6462$	0,9942

En las figuras 20 y 21 es posible observar que existen diferencias importantes entre muestras considerando el total de HAPs presentes estudiados. La figura 20 incluye aquellos HAPs que fueron sólo detectados, en cambio la figura 21 muestra el total de HAPs cuantificados en las muestras, siendo significativo que las muestras de mayor profundidad presenten las mayores diferencias con respecto a las superficiales; las cuales se encuentran entre 0,124 y 0,740 ng mL<sup>-1</sup>. Lo anterior implica que es observable diferencias entre las muestras correspondientes a los diferentes estratos, por lo cual una asociación con otros análisis puede resultar útil en la interpretación de estos resultados. Además, considerando que la metodología HLLÉ requiere pequeños volúmenes de muestra podría aplicarse sin problemas a las distintas secciones de un testigo de hielo, sin necesidad de mezclarlas, pudiendo conservarse la resolución temporal que permite la fusión, obteniendo mayor detalle de la distribución de los compuestos en el perfil de hielo.

Las características del testigo de hielo IC-5 en si (perfil vertical, temperatura y origen), permiten inferir que no existe percolación ni movilización de los compuestos entre las secciones, por lo cual las diferencias observadas deben corresponder a diferencias existentes en las concentraciones que se depositaron en la nieve inicialmente.

En general los HAPs de alto peso molecular (4-6 anillos aromáticos) son asociados fundamentalmente con procesos de combustión, encontrándose además en aguas residuales,

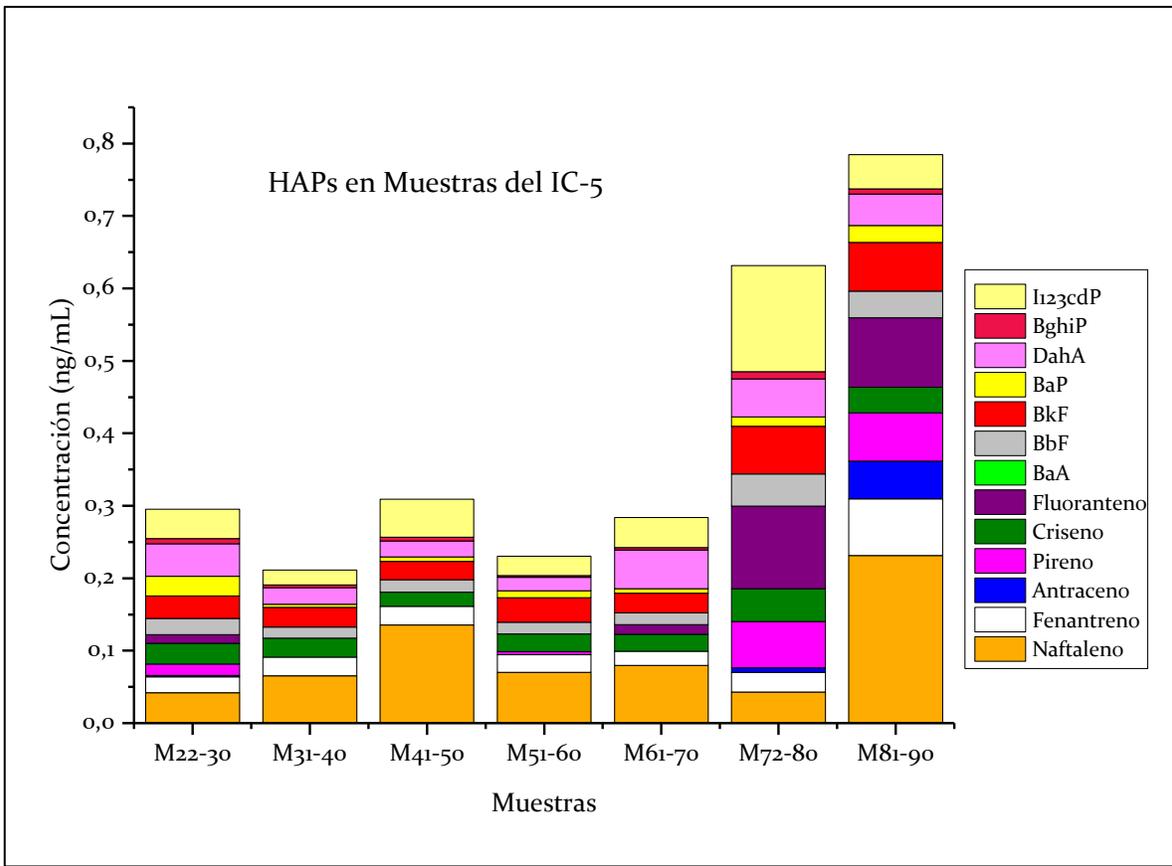
pequeños derrames de combustibles y en la naturaleza en el petróleo y por transformación biogénica. En esta investigación se observó el predominio de estos HAPs en todas las muestras (figura 20). Sin embargo, en el estudio del origen de HAPs en muestras ambientales son más utilizadas las razones moleculares en la identificación de posibles fuentes, teniendo definido un intervalo de valores para cada cual; dentro de ellas están antraceno/(antraceno+fenantreno), fluoranteno/(fluoranteno+pireno), BaA/(BaA+criseno) y I123cdP/(I123cdP+BghiP) [Yunker y col., 2002]. En este trabajo se realizó un estudio exploratorio al respecto, encontrándose la posibilidad de calcular dos de las relaciones antes mencionadas, pues no todos los compuestos requeridos idealmente pudieron ser cuantificados. De acuerdo a la información de la tabla 31, se pueden calcular para algunas muestras antraceno/(antraceno+fenantreno), I y fluoranteno/(fluoranteno+pireno), II. La muestra M22-30 presenta un valor de 0,43 para II. La muestra M72-80 presenta un valor de 0,18 para I y 0,64 para II, en tanto que la muestra M81-90 presenta valores de 0,40 y 0,59 para I y II respectivamente. De acuerdo a trabajos relacionados [Dvorská y col., 2011; Wang y col., 1999; Yunker y col., 2002], esto implica que los valores obtenidos para II, en la muestra M22-30 podrían dar cuenta de combustión de petróleo, mientras que las muestras M72-80 y M81-90 podrían tener relación con combustión de madera, carbón y/o pasto, lo que estaría de acuerdo a los valores de I para estas últimas, ya que sus valores se relacionan con fuentes pirogénicas. No obstante, para una asignación inequívoca de fuentes de origen se requiere contar con datos sobre razones moleculares adicionales, realizar una comparación con otros marcadores químicos y disponer de antecedentes sobre circulación atmosférica global y local, junto con la datación de las muestras.

La suma de las concentraciones de los HAPs cuantificados permitió obtener el total de HAPs en las muestras observándose una marcada diferencia entre los estratos superficiales y los más profundos. Estas diferencias podrían tener relación con algún hecho ocurrido en los años que están asociados, sin embargo para esta interpretación se requiere información complementaria.

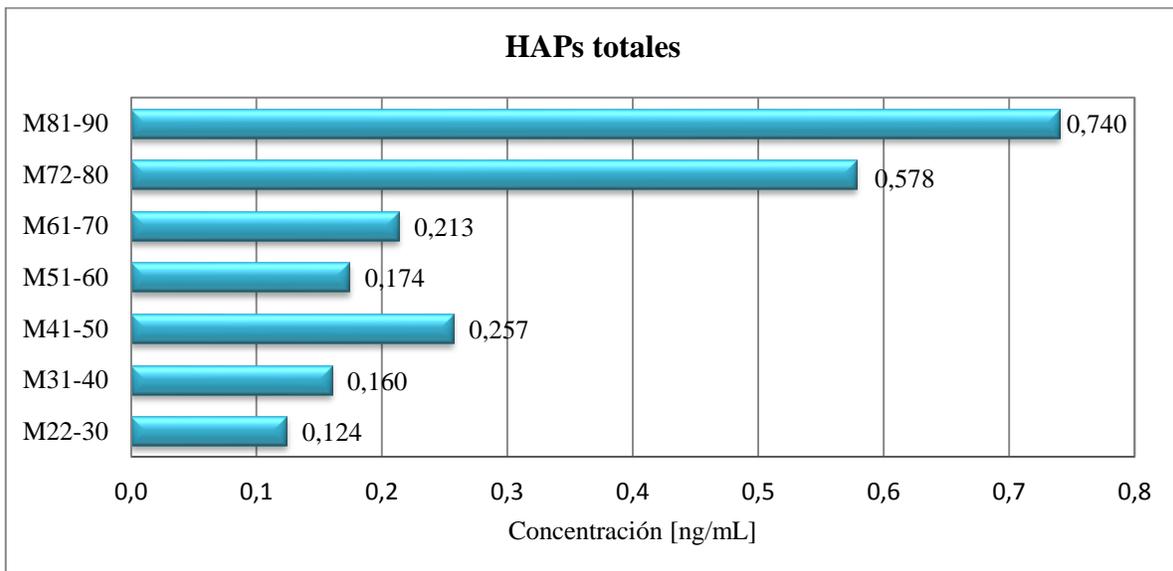
**Tabla 31.** Resultados de la determinación por HPLC-HPLC-FLD de HAPs en las muestras de testigos de hielo.

*HAP	M22-30	M31-40	M41-50	M51-60	M61-70	M72-80	M81-90
Naftaleno	D	0,0653 (0,0014)	0,1355 (0,0082)	0,0702 (0,0044)	0,0797 (0,0036)	D	0,2314 (0,0107)
Fenantreno	D	0,0259 (0,0025)	0,0258 (0,001)	D	D	0,0271 (0,0032)	0,0784 (0,0069)
Antraceno	D	ND	ND	ND	ND	0,0064 (0,0013)	0,0516 (0,001)
Fluoranteno	0,012 (0,0025)	ND	ND	ND	0,0133 (0,0004)	0,1141 (0,0061)	0,096 (0,006)
Pireno	0,0157 (0,0029)	ND	ND	D	ND	0,0639 (0,0031)	0,0671 (0,0019)
BaA	ND						
Criseno	0,0284 (0,0018)	0,0263 (0,0050)	0,0195 (0,0033)	0,0241 (0,0027)	0,0236 (0,0004)	0,0454 (0,0018)	0,0351 (0,0007)
BbF	D	D	D	D	D	0,0443 (0,0031)	D
BkF	D	D	D	D	D	0,0655 (0,0102)	0,0672 (0,0095)
BaP	0,0274 (0,0047)	D	D	D	D	D	0,0235 (0,0006)
DahA	0,0449 (0,0053)	0,0229 (0,0018)	0,0222 (0,0069)	0,0185 (0,0004)	0,0538 (0,0011)	0,0524 (0,0029)	0,0433 (0,0089)
BghiP	D	ND	D	ND	ND	D	D
I123cdP	0,0406 (0,0057)	0,0204 (0,0010)	0,0525 (0,0012)	0,0267 (0,0005)	0,0417 (0,0013)	0,1468 (0,0119)	0,0474 (0,0058)
Coroneno	ND						
V <sub>M</sub> /V <sub>E</sub>	51	49	54	56	49	53	47

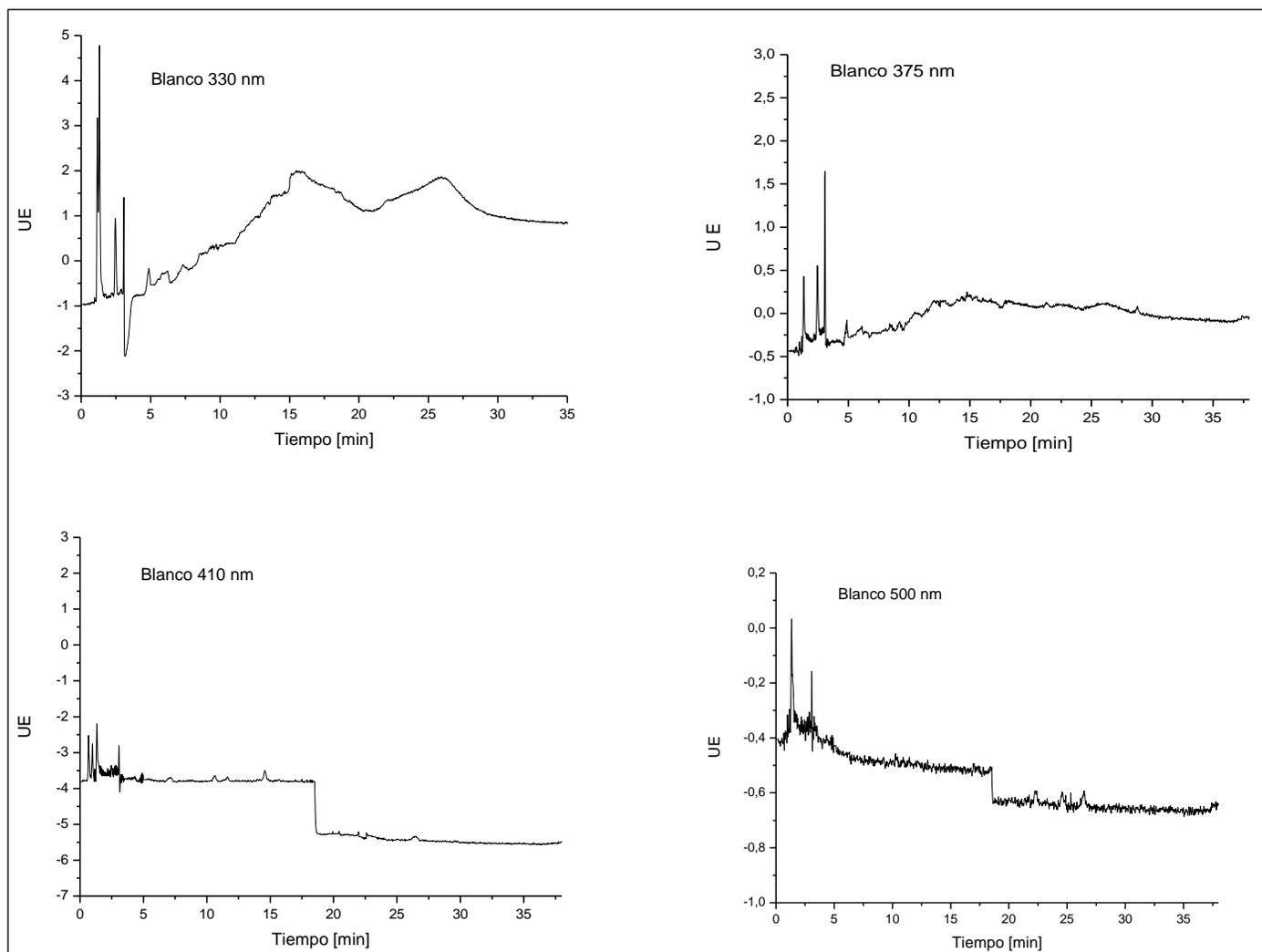
\* Concentraciones en ng mL<sup>-1</sup> y desviación estándar respectiva en paréntesis. VM/VE: relación volumen de muestra/volumen de extracto promedio. D: detectado (sobre LD); ND: no detectado (bajo LC)



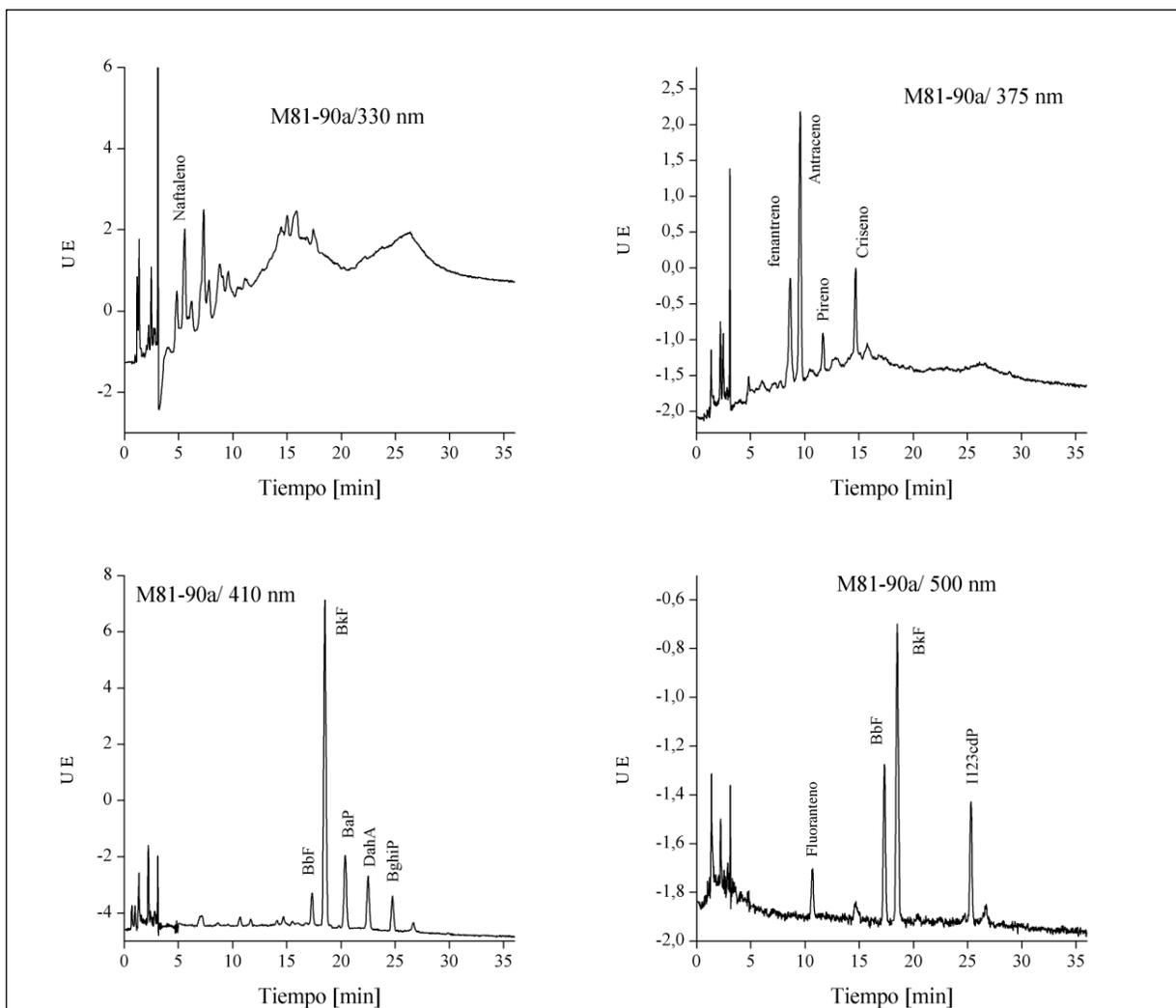
**Figura 20.** HAPs en muestras de testigo de hielo de antártica.



**Figura 21.** HAPs totales en IC-5



**Figura 22.** Cromatogramas de uno de los blancos utilizado en la medición de las muestras del IC-5



**Figura 23.** Cromatogramas de la muestra M81-90a

En 2010 Martins y col. informaron la presencia de HAPs en muestras de sedimentos de la Isla Rey Jorge, encontrando concentraciones de HAPs totales con marcados máximos en el perfil de sedimentos. Por ejemplo el testigo de sedimento A ( $62^{\circ} 05,33' S$  y  $58^{\circ}22,898' O$ ) fue de 20 m, en las inmediaciones de la base brasileña Comandante Ferraz, datado entre 1957 a 2006, encontrándose máximos en los períodos correspondientes a 1995/1997 de  $454,9 \text{ ng g}^{-1}$ , 1969/1972 con  $106,3 \text{ ng mL}^{-1}$  y 1957/1966 de  $46,9 \text{ ng mL}^{-1}$ . Al tener asociados años a cada sección de sedimento y antecedentes históricos del lugar de extracción fue posible explicar dichos máximos. Así, entre 1995/1996 una descarga de aguas residuales próximo al sector de muestreo sería la fuente principal de los compuestos; en los otros dos períodos se efectúa el fin de las operaciones de la base británica anterior a Ferraz en el mismo lugar, teniendo un aumento del tráfico marítimo por la implementación de la base brasileña y el establecimiento de varias estaciones de investigación en el sector desde 1948 a 1969. Se define así la distribución de los HAPs como la asociación con las actividades científicas, principalmente de la base Ferraz. En cuanto a la asignación de fuentes que realizan los autores se basan en las razones moleculares antes mencionadas, sugiriendo por los valores obtenidos para fluoranteno/(fluoranteno+pireno), que los HAPs son derivados principalmente de combustión de biomasa y carbón (valor superior a 0,5), con pequeña contribución de combustión de petróleo (valor entre 0,4 y 0,5). Consecuentemente BaA/(BaA+criseno) y I123cdP/(I123cdP+BghiP) indicaron predominancia de combustión, específicamente de biomasa y carbón, siendo asociadas a las actividades de las bases científicas del sector. Esto ilustra respecto a la importancia de la información complementaria, como la datación de las muestras, en la interpretación de los resultados. Tener datos asociados a períodos puede ayudar a la búsqueda de información histórica que permita explicar las variaciones de concentraciones de los analitos y su relación con hechos concretos. Sobre las muestras del testigo de hielo IC-5 analizadas sólo se tienen antecedentes de su localización y que corresponde a un período de 4 años, desde el verano de 2000/2001 hasta 2003/2004, pero no se conoce la asignación de estaciones ni años a las muestras específicas con claridad.

Otras investigaciones de HAPs en agua de mar corresponden a las de Cincinelli en el mar de Ross [Cincinelli y col., 2009; Stortini y col., 2009]. En 2008, Cincinelli y col., informaron concentraciones de HAPs totas entre  $1,21$  a  $3,96 \text{ ng L}^{-1}$  en fase disuelta y entre  $1,53$  a  $8,17 \text{ ng L}^{-1}$  en el extracto de la fase particulada para muestras de agua de mar recolectadas

durante verano 2000/2001 a diferentes profundidades y en diferentes sectores del mar de Ross. El predominio de HAPs de bajo peso molecular en las muestras indicó niveles de contaminación por derrames de combustibles bajos, atribuidos al momento del muestreo, además la irregular aparición de otros HAPs sugiere que el transporte atmosférico de largo alcance es una fuente menor de contaminantes en la región. En 2009 Stortini y col., informan concentraciones entre 5,27 y 9,43 ng L<sup>-1</sup> en muestras de agua subsuperficiales (0,5 m de profundidad/ 74°41' S– Long.164°07'85" E) y entre 7,32–23,94 ng L<sup>-1</sup> en la capa superficial para la fase disuelta y particulada respectivamente. Estas concentraciones fueron consideradas extremadamente bajas. Se detectó predominio de HAPs de 3 anillos en la fase disuelta y de los de mayor peso molecular en la fase particulada. Las razones moleculares fueron utilizadas en el estudio de las fuentes de los compuestos encontrándose origen petrogénico debido a procesos naturales o a nivel local por pequeños derrames y fugas, sin embargo, explican la dificultad de asignar la contribución sólo a estas fuentes, ya que los HAPs son altamente resistentes a procesos de degradación y su presencia en Antártica podría ser atribuida adicionalmente al transporte de largo alcance de masas de aire enriquecidas. Fuoco y col., en 2009, reportaron presencia de HAPs en una investigación también realizada en agua del mar de Ross, en muestras de agua superficial correspondientes a varias expediciones. La concentración media de HAPs totales encontrada fue de 220 pg L<sup>-1</sup>, siendo menor que la observada para muestreos anteriores (período de 1998 a 2003). La razón fenantreno/antraceno fue utilizada en la asignación de fuentes, resultando asociación a procesos petrogénicos. Dicha relación puede ser utilizada para distinguir entre origen petrogénico y pirogénico; ésta es dependiente de la temperatura, teniéndose que en los procesos pirolíticos de alta temperatura la característica es un valor bajo de fenantreno/antraceno y si es contaminación petrogénica los valores serán mayores. De este modo, valores mayores a 5 están asociados a estas últimas y menores que 5 a las primeras. En el caso de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, el cálculo es posible sólo en el caso de las muestras M72-80 y M81-90 obteniéndose valores de 4,5 y 1,5 respectivamente, que podrían asociarse a fuentes pirogénicas, lo que es consecuente con los otros valores de razones calculados. Dado que son las muestras más profundas podría decirse que algún evento tuvo efecto en la presencia de los HAPs en estas secciones del testigo de hielo, sin embargo, se requiere información adicional para realizar una afirmación sobre el origen de estos compuestos en las muestras.

El trabajo antes expuesto constituye información única respecto a la presencia de HAPs en muestras prístinas, correspondientes a secciones de un testigo de hielo del continente Antártico, proveniente de una zona remota con escasa presencia de actividad antropogénica. En futuros trabajos será posible abordar el estudio en otros testigos de hielo, con fines paleoclimáticos o ambientales con una gran resolución temporal, pudiendo complementar la información proveniente de los análisis químicos en este tipo de investigación.

## 7. CONCLUSIONES

- Se establecieron las condiciones instrumentales para la separación y cuantificación de 17 hidrocarburos aromáticos policíclicos mediante HPLC-DAD y/o HPLC-FLD. Los límites de detección y cuantificación obtenidos para la primera metodología se encuentran en los intervalos 1,7 y 21,3 ng mL<sup>-1</sup> y 5,6 y 71,1 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Para HPLC-FLD se encuentran entre 0,08 y 0,17 ng mL<sup>-1</sup> y 0,27 y 0,57 ng mL<sup>-1</sup>. Estas metodologías sirven al propósito de determinar estos compuestos en muestras acuosas diluidas en niveles traza y ultra-traza. En los intervalos de concentración estudiados ambas responden al modelo lineal con coeficientes de determinación superiores a 0,994.
- El análisis multivariado permitió definir los factores que afectan la eficiencia de la técnica HPLE y su optimización para su aplicación en la extracción de HAPs utilizando pequeños volúmenes de muestra, adecuados para el estudio de la presencia de estos contaminantes en muestras acuosas prístinas. Luego de la optimización se validó la técnica para cada una de los métodos de determinación, HPLC-DAD y HPLC-FLD. Los límites de detección y de cuantificación para HPLE-HPLC-DAD se encuentran en el intervalo 0,78 y 5,11 ng mL<sup>-1</sup> y 2,60 y 17,0 ng mL<sup>-1</sup>. Para la detección por fluorescencia estos intervalos estuvieron entre 0,0015 y 0,0203 y 0,0051 y 0,0676 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente. En todos los casos los valores de los coeficientes de determinación para la respuesta lineal del proceso analítico total fueron superiores a 0,98.
- Se obtuvieron factores de enriquecimiento entre 32 y 43 en el intervalo 8-50 ng mL<sup>-1</sup> para HPLE-HPLC-DAD y 34 y 49 en el intervalo 0,03-0,11 ng mL<sup>-1</sup> para HPLE-HPLC-FLD. Los porcentajes de recuperación obtenidos en las condiciones óptimas para una concentración de HAPs en un nivel de 20 ng mL<sup>-1</sup> variaron entre 67,4 y 91,6% con una desviación estándar relativa entre 0,7 y 5,1%. Para la detección por fluorescencia en un intervalo de concentraciones de

0,048 y 0,13 ng mL<sup>-1</sup> las recuperaciones promedio estuvieron entre 71 y 99 %, con desviaciones estándar relativas entre 1,1 y 9,9%.

- La exactitud y precisión obtenidas mediante la metodología HPLC-FLD resultaron adecuadas para la detección y cuantificación de HAPS en las muestras del testigo de hielo IC-5, considerando las bajas concentraciones y pequeños volúmenes de muestra disponibles.
- Se detectó la presencia de algunos compuestos y en algunos casos el método también permitió su cuantificación en un testigo de hielo proveniente de una zona remota con escasa actividad antropogénica. Se descartó la posible contaminación de muestras por la ausencia de todos los analitos en los blancos y de algunos compuestos en las muestras.
- Un análisis preliminar de la composición de las muestras podría indicar un origen relacionado con combustión de madera, carbón y/o pasto, sin embargo, los antecedentes son insuficientes para determinar el origen de los compuestos en las muestras analizadas.
- La información obtenida en esta tesis es única respecto a la presencia de HAPs en muestras de un testigo de hielo del continente Antártico. En futuros trabajos será posible abordar el estudio en otros testigos de hielo, con fines paleoclimáticos o ambientales con una gran resolución temporal, pudiendo complementar la información proveniente de los análisis químicos necesaria para este tipo de investigación.

## 8. REFERENCIAS

1. Aislabe, J., Balks, M., Astori, I., Stevenson, G., Symons, R., 1999, "Polycyclic aromatic hydrocarbons in fuel-oil contaminated soils, Antarctica", *Chemosphere* 39(13), 2201-2207.
2. Bargagli, R., 2008, "Environmental contamination in Antarctic ecosystems", *Science of the total environment* 400, 212-226
3. Bigler, M., Rothlisberger, R., Lambert, F., Wolff, E., Castellano, E., Udisti, R., Stocker, T., Fisher, H., 2010, "Atmospheric decadal variability from high-resolution Dome C ice core records of aerosol constituents beyond the last interglacial", *Quaternary Science Reviews*, 29, 324-337.
4. Blais, J., Schindler, K., Muir, D., Donald, D., Sharp, M., Lafreniere, M., Braekevelt, E., Strachan, W., Comba, M., Backus, S., 2001, "Melting glaciers dominate sources of persistent organochlorines to subalpine Bow Lake in Banff National Park, Canada", *Ambio*, 30, 410-415.
5. Bosch, C., Sánchez, F., 2009, "Separation and Preconcentration by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Procedure: A Review", *Chromatographia* 69 (11), 1-11.
6. Bourdat-Deschamps, M., Daudin, J., Barriuso, E., 2007, "An experimental design approach to optimise the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from rainfall water using stir bar sorptive extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection", *Journal of Chromatography A*, 1167, 143-153.
7. Braithwaite, R., Raper, S., 2002, "Glaciers and their contribution to the sea level change", *Physics and Chemistry of the Earth*, 27, 1445-1454.
8. Brum, M. D., Casella, R., Pereira, A., 2008, "Multivariate optimization of a liquid-liquid extraction of the EPA-PAHs from natural contaminated waters prior to determination by liquid chromatography with fluorescence detection", *Talanta* 74, 1392-1399.
9. Callen, M., de la Cruz, M., López, J., Murillo, M., Navarro, M., Mastral, A., 2008, "Long-Range Atmospheric Transport and Local Pollution Sources on PAH Concentrations in South European Urban Area. Fulfilling of the European Directive", *Water Air Soil Pollut* 190, 271-285.
10. Cheng, J., Matsadiq, G., Liu, L., Zhou, Y., Chen, G., 2011, "Development of a novel ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction method and

its application to the analysis of eleven polycyclic aromatic hydrocarbons at trace levels in water”, *Journal of Chromatography A* 1218, 2476-2482.

11. Cincinelli, A., Stortini, A.M., Checchini, L., Martelli, T., Del Bubba, M., Lepri, L., 2005, “Enrichment of organic pollutants in the sea surface microlayer (SML) at Terra Nova Bay, Antarctica: influence of SML on superficial snow composition”, *Journal of Environmental Monitoring* 7, 1305-1307.

12. Cincinelli, A., Martellini, T., Bittoni, L., Russo, A., Gambaro, A., Lepri, L., 2008, “Natural and anthropogenic hydrocarbons in the water column of the Ross Sea (Antarctica)”, *Journal of Marine Systems*, 73, 208-220.

13. Cripps, G., Priddle, J., 1991, Review “Hydrocarbons in the Antarctic marine environment”, *Antarctic Science* 3 (3), 233-250.

14. Cripps, G., Shears, J., 1997, “The fate in the marine environment of a minor diesel fuel spill from an antarctic research station”, *Environmental Monitoring and Assessment* 46, 221-232.

15. Curran, A.J. and Palmer, A.S, 2001, “Suppressed ion chromatography methods for the routine determination of ultra low level anions and cations in ice core”, *J. of Chromatography A*, 919, 107-113.

16. Curtosi, A., Pelletier, E., Vodopivec, C., 2007, “Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and surface marine sediment near Jubany Station (Antarctica)”, *Role of permafrost as a low-permeability barrier*, *Science of the total environment*, 383(1-3), 193-204.

17. Denis, E., Toney, J., Tarozo, R., Anderson, S., Roach, L., Huang, Y., 2012, “Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in lake sediments record historic fire events: Validation using HPLC-fluorescence detection”, *Organic Geochemistry* 47, 7-17

18. Dixon, D., 2004, “High Resolution Antarctic Climate Proxy Records and Their Global Implications”, Thesis Proposal, University of Maine, U.S.A.

19. Donald, D.B., Syrgiannis, J., Crosley, R.W., Holdsworth, G., Muir, D.C.G., Rosenberg, B., Sole, A., Schindler, D.W., 1999, “Delayed deposition of organochlorine pesticides at a temperate glacier”, *Environmental Science and Technology* 33, 1794-1798.

20. Doong, R., Chang, S., Sun, Y., 2000, “Solid-phase microextraction for determining the distribution of sixteen US Environmental Protection Agency polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples”, *Journal of Chromatography A* 879, 177-188.

21. Dvorská, A., Lammel, G., Klánová, J., 2011, "Use of diagnostic ratios for studying source apportionment and reactivity of ambient polycyclic aromatic hydrocarbons over Central Europe", *Atmospheric Environment* 45, 420-427.
22. Espizua, L., Pitte, P., 2009, "The little ice age glacier advance in the Central Andes (35°S), Argentina", *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 281, 345-350.
23. Fischer, H., Fundel, F., Ruth, U., Tarloh, B., Wegener, A., Udisti, R., Becagli, S., Castellano, E., Mornganti, A., 2007, "Reconstruction of millennial changes in dust emission, transport and regional sea ice coverage using the deep EPICA ice cores from the Atlantic and Indian Ocean sector of Antarctica", *Earth and Planetary Science Letters* 260, 340-354.
24. Frolova, N., Zinchenko, G., Papina, T., 2009, "Regional atmospheric and dust of Mt. Belukha glacier", *Geography and Natural Resources* 30, 26-29.
25. Fujita, K., 2008, "Effect of precipitation seasonality on climatic sensitivity of glacier mass balance", *Earth and Planetary Science Letters* 276, 14-19.
26. Fuoco, R., Giannarelli, S., Wei, Y., Abete, C., Francesconi, S., Termine, M., 2005, "Polychlorobiphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in the sea-surface micro-layer and the water column at Gerlache Inlet, Antarctica", *Journal of Environmental Monitor* 7(12), 1313-1319.
27. Gabrielli, P., Barbante, C., Boutron, C.F., Cozzi, G., Gaspari, V., Planchon, F., Ferrari, C.P., Turetta, C., Hong, S., Cescon, P., 2005, "Variations in atmospheric trace elements in Dome C (East Antarctica) ice over the last two climatic cycles", *Atmospheric Environment* 39, 6420-6429.
28. Ginot, P., Schwikowski, M., Gäggeler, H. W., Schotterer, U., Kull, C., Funk, M., Rivera, A., Stampfli, F., Stichler, W., 2002, "First results of paleoatmospheric chemistry and climate study of Cerro Tapado glacier, Chile", *The Patagonian Icefields*, 157-167.
29. Gregor, D., Teixeira, C., Rowsell, R., 1996, "Deposition of atmospherically transported polychlorinated biphenyls in the Canadian Arctic", *Chemosphere* 33, 227-244.
30. Godoy, M., Shiraiwa, T., Kohshima, S. and Kubota, K., 2002, "Firn-core drilling operation at Tyndall glacier, southern Patagonia Icefield", *The Patagonian Icefields*, 149-156.
31. González-Piñuela, C., Alonso-Salces, R., Andrés, A., Ortiz, I., Viguri, J. Validated analytical strategy for the determination of polycyclic aromatic compounds in

marine sediments by liquid chromatography coupled with diode-array detection and mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A* 1129, 189-200.

32. Gouin, T., Mackai, D., Jones, K., Harner, T., Meijer, S., 2004, “Evidence for the "grasshopper" effect and fractionation during long-range atmospheric transport of organic contaminants”, *Environmental Pollution* 128 (1–2), 139–148.

33. Hammes, D.F., Vieira, R, Simões, J.C., Reis Dos Santos, M. A., Ceron, M. S., 2007, “Preparação de amostras para análise geoquímica de testemunhos de gelo na Antártica”, *Programas e Resumos do XV Simpósio Brasileiro sobre Pesquisa Antártica*, São Paulo, USP, 1, 20.

34. Herbert, B.M.J., Halsalla, C.J., Jonesa, K.C., Kallenbornet, R., 2006, “Field investigation into the diffusion of semi-volatile organic compounds into fresh and aged snow”, *Atmospheric Environment* 40, 1385–1393.

35. Hermanson, M.H., Isaksson, E.H., Teixeira, C., Muir, D.C.G., Compher, K. M., Li, Y.F., Igarashi, I., Kamiyama, K., 2005, “Current use and legacy pesticide history in the Austfonna ice cap, Svalbard, Norway”, *Environmental Science and Technology* 39, 8163–8169.

36. Herrera-Herrera, A., Asensio-Ramos, M., Hernández-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M., 2010, “Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes”, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 29, 727-751.

37. Jansson, P., Hock, R. and Schneider, T., 2003, “The concept of glacier storage: a review”, *Journal of Hydrology*, 282, 116–129.

38. Kang, J., Choi, S., Park, H., Baek, S., Chang, Y., 2009, “Atmospheric deposition of persistent organic pollutants to the East Rongbuk Glacier in the Himalayas”, *Science of Total Environment* 408, 57-63.

39. Kruger, O., Christoph, G., Kalbe, U., Berger, W., 2011, “ Comparison of stir bar sorptive extraction (SBSE) and liquid-liquid extraction (LLE) for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in complex aqueous matrices”, *Talanta* 85, 1428-1434.

40. Kazuho, H., Uchida, T., Sakamoto, Y., Ohta, A., Matsuzaki, H., Shibata, Y., Motoyama, H., 2008, “Ice core record of Be over the past millenium from Dome Fuji, Antarctica: A new proxy record of past solar activity and powerful tool for the statigraphic dating”, *Quaternary Geochronology* 3, 253-261.

41. Kreutz, K.J., Mayewski, P.A., Pittalwala, I.I. Meeker, L.D., Twickler, M.S. and Whitlow, S.I, 2000, “Sea-level pressure variability in the Amundsen Sea region inferred

from a West Antarctic glaciochemical record”, *Journal of Geophys. Res.* 105(D3), 4047–4059.

42. Kim, M., Kennicut, M.C., Qian, Y., 2006, “Molecular and stable carbon isotopic characterization of PAH contaminants at McMurdo Station, Antarctica”, *Marine Pollution Bulletin* 52, 1585–1590.

43. Konz, M., Sievert, J., 2010, “On the value of glacier mass balances for hydrological model calibration”, *Journal of Hydrology* 385, 238-246.

44. Lammel, G., Sehili, A., Bond, T., Feichter, J., Grassl, H., 2009, “Gas/particle partitioning and global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons – A modelling approach”, *Chemosphere* 76, 98–106.

45. Leiva, J., Cabrera, G., Lenzano, L., 2007, “20 years of mass balances on the Piloto glacier, Las Cuevas river basin, Mendoza, Argentina”, *Global and Planetary Change* 59, 10-16.

46. Leong, M.I., Huang, S., 2010, “Low toxic dispersive liquid-liquid microextraction using halosolventes for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples”, *Journal of Chromatography A* 1211, 8-12.

47. Leong, M.I., Chang, C., Fuh, M., Huang, S., 2010, “Dispersive liquid–liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection”, *Journal of Chromatography A* 1217, 5455-5461.

48. Ligget, D., McIntosh, A., Thompson, A., Gilbert, N., Storey, B., 2011, “From frozen continent to tourism hotspot? Five decades of Antarctic tourism development and management, and a glimpse into the future”, *Tourism Management* 32, 357-366.

49. Lohman, R., Breivik, K., Dachs, J., Muir, D., 2007, Review “Global fate of POPs: Current and future research directions”, *Environmental Pollution* 150 (1), 150–165.

50. Ma, J., Xiao, R., Li, J., Yu, J., Zhang, Y., Cheng, L., 2010, “Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples by solid-phase extraction using multi-walled carbon nanotubes as adsorbent coupled with gas chromatography–mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A* 1217, 5462–5469.

51. Martins, C., Bicego, M., Rose, N., Taniguchi, S., Lourenco, R., Figueira, R., Mahiques, M., Montone, R., 2010, “Historical record of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and spheroidal carbonaceous particles (SCPS) in marine sediment

cores from Admiralty Bay, King George Island, Antarctica”, *Environmental Pollution* 158, 192-200.

52. Masclet, P., Cachier, H., Liousse, K., Wortham, H., 1995, “Emissions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon by Savanna Fires”, *Journal of Atmospheric Chemistry* 22, 41-54.

53. Masclet, P., Hoyau, V., Jaffrezo, J.L., Cachier, H., 2000, “Polycyclic aromatic hydrocarbon deposition on the ice sheet of Greenland. Part I: superficial snow”, *Atmospheric Environment* 34, 3195-3207.

54. Meier, M. F., 1984, “Contribution of small glaciers to global sea level”, *Science*, 226 (4681), 1418-1421.

55. Meyerson, E.A., Mayewski, P.A., Kreutz, K.J., Meeker, L.D., Whitlow, S.I., and Twickler, M.S., 2002, “The polar expression of ENSO and sea-ice variability as recorded in a South Pole ice core”, *Ann. Glaciol.* 35, 430-436.

56. Miege, C., Dugay, J., Hennion, M., 2003, “Optimization, validation and comparison of various extraction techniques for the trace determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges by liquid chromatography coupled to diode-array and fluorescence detection”, *Journal of Chromatography A* 995, 87-97.

57. Minero, C., Maurino, V., Borghesi, D., Pelizzetti, E., Vione, D., 2010, “An overview of possible processes able to account for the occurrence of nitro-PAHs in Antarctic particulate matter”, *Microchemical Journal* 96, 213–217

58. Nabbefeld, B., Grice, K., Summons, R., Hays, L., Cao, C., 2010, “Significance of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Permian/Triassic boundary sections”, *Applied Geochemistry* 25, 1374–1382.

59. O'Brien, S.R., Mayewski, P.A., Meeker, L.D., Meese, D.A., Twickler, M.S. and Whitlow, S.I., 1995, “Complexity of Holocene climate as reconstructed from a Greenland ice core”, *Science* 270 (5244), 1962-1964.

60. Ohno, H., Igarashib, M., Hondoha, T., 2005, “Salt inclusions in polar ice core: Location and chemical form of water-soluble impurities”, *Earth and Planetary Science Letters* 232, 171–178.

61. Okuda, T., Daisuke Naoi, D., Tenmoku, M., Tanaka, S., He, K., Ma, Y., Yang, F., Lei, Y., Jia, Y., Zhang, D., 2006, “Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the aerosol in Beijing, China, measured by aminopropylsilane chemically-bonded stationary-phase column chromatography and HPLC/fluorescence detection”, *Chemosphere* 65, 427–435.

62. Osterberg, E., Handley, M. J., Sneed, Sh. B., Mayewski, P. A. and Kreutz, K., 2006, "Continuous Ice Core Melter System with Discrete Sampling for Major Ion, Trace Element and Stable Isotope Analyses", *Environ. Sci. Technol.* 40, 3355-3361.
63. Pena-Pereira, F., Lavilla, I., Bendicho, C., 2012, Review "Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review", *Spectrochimica Acta Part B* 64, 1-15.
64. Peters, A.J., Gregor, D.J., Teixeira, C.F., Jones, N.P., Spencer, C., 1995, "The recent depositional trend of polycyclic aromatic hydrocarbons and elemental carbon to the Agassiz Ice Cap, Ellesmere Island, Canada", *The Science of the Total Environment* 160/161, 167-179.
65. Préndez, M., Barra, C., Toledo, C., Richter, P., 2011, "Alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in marine surficial sediment near Antarctic stations at Fildes Peninsula, King George Island", *Antarctic Science* 23 (6), 578-588.
66. Prieto-Blanco, M., Piñeiro, M., López-Mahía, P., Muniategui, S., Prada, D., 2010, "Simultaneous determination of carbonyl compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter by liquid chromatography-diode array detection-fluorescence detection", *Talanta* 80, 2083-2092.
67. Ramdahl, T., 1983, "Retene a molecular marker of wood combustion", *Nature* 306, 580-582.
68. Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseini, M., Aghaee, E., Ahmadi, F., Berijani, S., 2006, "Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction", *Journal of Chromatography A* 116, 1-9.
69. Rezaee, M., Yamini, Y., Faraji, M., 2010, "Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method", *Journal of Chromatography A* 1217, 2342-2357.
70. Sarafraz-Yazdi, A., Amiri, A., 2010, "Liquid-phase microextraction", *Trends in Analytical Chemistry* 29, 1-14.
71. Shamsipur, M., Hassan, J., 2010, "A novel miniaturized homogenous liquid-liquid solvent extraction-high performance liquid chromatographic-fluorescence method for determination of ultra traces of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment samples", *Journal of Chromatography A* 1217, 4877-4882.

72. Sicart, J., Ribstein, P., Francou, B., Pouyaud, B., Condom, T., 2007, "Glacier mass balance of tropical Zongo glacier, Bolivia, comparing hydrological and glaciological methods", *Global and Planetary Change* 59, 27-36.
73. Singh, P., Haritashya, U.K. and Kumar, N., 2004, "Seasonal changes in melt water storage and drainage characteristics of the Dokriani Glacier, Garhwal Himalayas (India)", *Nord Hydrol.* 35 (1), 15–29.
74. Singh, P., Haritashya, U.K., Ramasastry, K.S. and Kumar, N., 2005, "Diurnal variations in discharge and suspended sediment concentration including runoff delaying characteristics of the Gangotri Glacier in Garhwal Himalayas", *Hydrol. Proc.* 19, 1445–1457.
75. Slater, J.F., Currie, L.A., Dibb, J.E., Benner, B.A., 2002, "Distinguishing the relative contribution of fossil fuel and biomass combustion aerosols deposited at Summit, Greenland through isotopic and molecular characterization of insoluble carbon", *Atmospheric Environment* 36, 4463-4477.
76. Solomina, O., Haerberli, W., Kull, C., Wiles, G., 2008, "Historical and Holocene glacier-climate variations: general concepts and overview", *Global and Planetary Change* 60, 1-9.
77. Stortini, A.M., Martellini, T., Del Bubba, M., Lepri, L., Capodaglio, G., Cincinelli, A., "n-Alkanes, PAHs and surfactants in the sea surface microlayer and sea water samples of the Gerlache Inlet sea (Antarctica), *Microchemical Journal* 92, 37–43.
78. Tavakoli, L., Yamini, Y., Ebrahimzadeh, H., Shariati, S., 2008, "Homogeneous liquid–liquid extraction for preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons using a water/methanol/chloroform ternary component system", *Journal of Chromatography A* 1196-1197, 133-138.
79. Villa, S., Vighi, M., Maggi, V., Finizio, A., Bolzacchini, E., 2003, "Historical Trends of Organochlorine Pesticides in an Alpine Glacier", *Journal of Atmospheric Chemistry* 46, 295-311.
80. Vincent, C., Ribstein, P., Favier, V., Wagnon, P., Francou, B., Le Meur, E., Six, D., 2005, "Glacier fluctuations in the Alps and in the tropical Andes", *C. R. Geoscience* 337, 97-106.
81. Von Schneidmesser, E., Schauer, J., Shafer, M., Hagler, G., Bergin, M., Steig, E., 2008, "A method for the analysis of ultra-trace levels of semi-volatile and non-volatile organic compounds in snow and application to Greenland snow pit", *Polar Science*, 1-16.

82. Wah Lim, L., Okouchi, Y., Takeuchi, T., 2007, "On-line preconcentration of trace carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (HAPs) in microcolumn liquid chromatography via large injection", *Talanta* 72(5), 1600–1608.
83. Wang, Z., Fingas, M., Page, D., 1999, Review "Oil spill identification", *Journal of Chromatography A* 843, 369–411.
84. Wang, Xiao; Xu, B., Kang, S., Cong, Z., Yao, T., 2008, "The historical residue trends of DDT, hexachlorocyclohexanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in an ice core from Mt. Everest, central Himalayas, China", *Atmospheric Environment* 42, 6699-6709.
85. Wang, Xuedong; Zhao, X., Liu, X., Li, Y., Fu, L., Hu, J., Huang, C., 2008A, "Homogeneous liquid–liquid extraction combined with gas chromatography–electron capture detector for the determination of three pesticide residues in soils", *Analytica Chimica Acta* 620(1–2), 162–169.
86. Wilcke, W., 2007, Review "Global patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil", *Geoderma* 141, 157–166.
87. Windal, I., Boxus, L., Hanot V., 2008, "Validation of the analysis of the 15 + 1 European-priority polycyclic aromatic hydrocarbons by donor–acceptor complex chromatography and high-performance liquid chromatography–ultraviolet/fluorescence detection", *Journal of Chromatography A*, 1212, 16–22.
88. Wolska, L., 2008, Determination (monitoring) of PAHs in surface waters: why an operationally defined procedure is needed; *Anal. Bioanal. Chem.*, 391, 2647-2652.
89. Wu, Y., Xia, L., Chen, R., Hu, B., 2008, "Headspace single drop microextraction combined with HPLC for the determination of trace polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples", *Talanta* 74, 470–477.
90. Xu, J., Hou, S., Qin, D., Kaspari, S., Mayewski, P., Petit, J., Delmonte, B., Kang, S., Ren, J., Hong, S., 2010, "A 108.83-m ice-core record of atmospheric duct deposition at Mt. Qomolangma (Everest), Central Himalaya", *Quaternary Research* 73, 33-38.
91. Yunker, M., Macdonald, R., Vingarzan, R., Mitchell, R., Goyette, D., Sylvestre, S., 2002, "PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition", *Organic Geochemistry* 33, 489–515.
92. Zhang, Z., Xue, M., Dai, Z., 2010, "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic products by HPLC-fluorescence", *Journal of Food Composition and Analysis* 23, 469-474.

93. Zhao, X., Fu, L., Hu, J., Wang, H., Huang, C., Wang, X., 2009, "Analysis of PAHs in Water and Fruit Juice Samples by DLLME Combined with LC-Fluorescence Detection", *Chromatographia* 69 (11-12), 1-6.
94. Zgola-Grzeskowiak, A., Grzeskowiak, T., 2011, "Dispersive liquid-liquid Microextraction", *Trends in Analytical Chemistry* 30 (9), 1382-1399.
95. Zhoua, J.L., Maskaouib, K., 2003, "Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and surface sediments from Daya Bay, China", *Environmental Pollution* 121, 269–281.
96. Canadian council of ministers of the environment. PAHs [en línea] <[http://www.ccme.ca/assets/pdf/pah\\_soqg\\_scd\\_1445.pdf](http://www.ccme.ca/assets/pdf/pah_soqg_scd_1445.pdf)> [consulta: 8 de septiembre de 2012]
97. ATSDR en Español. Department of Health and Human Services [en línea] <[http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs69.html](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.html)> [consulta: 13 de julio de 2012]
98. ATSDR Department of Health and Human Services [en línea] <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69-c2.pdf>> [consulta: 13 de julio de 2012]
99. Laboratorio de Glaciología. ¿Qué es glaciología? [en línea] <<http://www.glaciologia.cl/presentacion.htm>> [consulta: 1 de septiembre de 2012].
100. University of Maine. ITASE. Climate and Environmental Change [en línea] <<http://www2.umaine.edu/itase/>> [consulta: 1 de septiembre de 2012].
101. Centro de Estudios Científicos. Glaciología y cambio climático [en línea] <<http://www.cecs.cl/web/>> [consulta: 1 de julio de 2012].