

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



**ESTUDIO DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DE LOS
HAPs EN MUESTRAS DE CEREALES Y SU ANÁLISIS POR
CROMATOGRFÍA DE GASES.**

Trabajo Especial de Grado

presentado ante la ilustre

Universidad Central de Venezuela,

por el Br. Reinaldo Rafael Mujica Pérez, para

optar al título de Licenciado en Química

Tutores:

Dr. Andrés Escalona.

Dra. Rosa Amaro.

Caracas, noviembre del 2010

INDICE

1.- Introducción	1
2.- Revisión Bibliográfica	3
2.1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)	3
2.2. Microextracción en Fase Sólida. (MEFS)	9
2.2.1 Ventajas de la MEFS	10
2.2.2 Desventajas de la MEFS	10
2.2.3 Fundamentos teóricos de la MEFS	11
2.2.4 Tipos de fibras de MEFS	13
2.2.5 Acondicionamiento de la fibra	17
2.2.6 Blanco de la fibra	17
2.2.7 Proceso de sorción y Desorción en la MEFS	18
2.2.8 Variables que afectan al proceso de MEFS	19
2.2.8.1 Etapa de absorción/adsorción	20
2.2.8.2 El tiempo de extracción en MEFS	20
2.2.8.3 Temperatura de extracción	21
2.2.8.4 Concentración de sal en la muestra y modificación del pH	21
2.2.8.5 El volumen de la muestra	21
2.2.8.6 Agitación de la muestra	22
2.2.8.7 Etapa de desorción	22

2.3. Cromatografía de Gases	23
2.3.1 Ventajas de la cromatografía de gases	24
2.3.2 Desventajas de la cromatografía de gases	24
2.3.3 Cromatógrafo de gases	25
2.3.3.1 Sistema de suministro del gas	26
2.3.3.2 Sistema de inyección de muestra	26
2.3.3.3 Puerto de inyección	27
2.3.3.4 Columna y fase estacionaria	29
2.3.3.5 Factores que afectan la eficiencia de una columna	31
2.3.3.6 La fase estacionaria	33
2.3.3.7 Horno del cromatógrafo de gases	35
2.3.3.8 Sistema de detección	35
2.4 Trigo	39
2.5 Maíz	40
2.5.1 Maíz blanco (<i>Vicia faba</i>).	41
2.5.2 Maíz amarillo (<i>Raphanus sativus</i>).	41
3.- Antecedentes	43
4.- Objetivos	48
4.1. Objetivos generales	48
4.2. Objetivos específicos	48

5.- Parte Experimental	49
5.1 Instrumentación	49
5.1.1 Cromatógrafo de gases	49
5.1.2 Preparación de la muestra	51
5.1.3 Sistema de sorción	51
5.2 Reactivos	52
5.3 Tipos de muestras	52
5.4 Procedimiento para la sorción de los analitos	53
5.4.1 Tratamiento de la muestra	53
5.4.2 Sorción de los analitos	53
5.4.2.1 Procedimiento experimental EC-MEFS-CG.	53
5.4.2.2 Procedimiento experimental ID-MEFS-CG.	54
5.4.3 Desorción de los analitos	54
5.5 Figuras de merito	55
6.- Resultados y discusiones	56
6.1 Selección de las condiciones del CG	56
6.2 Estudio por EC-MEFS-CG	57
6.2.1. Optimización de las masas de naftaleno, fluoreno y antraceno empleadas para la elaboración de las mezclas (I) y (II).	57
6.2.2 Selección de las condiciones óptimas de sorción y desorción de los HAPs por EC-MEFS-CG con la fibra de 65 µm de PDMS-DVB.	66

6.2.2.1 Etapa de sorción	66
6.2.2.2 Etapa de desorción	67
6.2.3 Estándar de referencia	67
6.2.3.1 Identificación de los HAPs presentes en el estándar de referencia	69
6.2.3.2. Evaluación de la fibra de 65 μm de PDMS-DVB, con el estándar de referencia	73
6.2.3.3. Confirmación de compuestos sorbidos por la fibra de 65 μm de PDMS-DVB, empleando la mezcla de patrones puros (III)	77
6.2.3.4 Estudio de otros compuestos	83
6.2.3.4.1 Evaluación de la mezcla de patrones puros (IV) y elaboración de la muestra sintética D	86
6.3 Estudio por ID-MEFS-CG	92
6.3.1 Selección de las condiciones óptimas de sorción y desorción de los HAPs por ID-MEFS-CG.	92
6.3.1.1. Selección de las condiciones de extracción de los HAPs.	92
6.3.1.2 Optimización del solvente a emplear	93
6.3.1.3 Etapa de sorción	99
6.3.1.3.1 Optimización de la temperatura de sorción para el proceso de ID-MEFS-CG.	99
6.3.1.3.2 Optimización del tiempo de sorción para el proceso de ID-MEFS-CG.	104
6.3.1.4 Etapa de Desorción	107
6.4 Comparación entre EC-MEFS-CG e ID-MEFS-CG	108

6.5 Análisis de las muestras	110
6.5.1 Análisis de las muestras de trigo	112
6.5.1.1 Muestra de trigo (TSRW), analizada por EC-MEFS-CG	112
6.5.1.2 Muestra de trigo (TSRW), analizada por ID-MEFS-CG	113
6.5.1.3 Muestra de trigo (TSRW), analizada por EC-MEFS-CG	115
6.5.1.4 Muestra de trigo (HRW), analizada por ID-MEFS-CG	116
6.5.2 Análisis de las muestras de maíz	119
6.5.2.1 Muestra de maíz amarillo, analizada por EC-MEFS-CG	119
6.5.2.2 Muestra de maíz amarillo, analizada por ID-MEFS-CG	120
6.5.2.3 Muestra de maíz blanco, analizada por EC-MEFS-CG	122
6.5.2.4 Muestra de maíz blanco, analizada por ID-MEFS-CG	123
6.6 Repetitividad del método empleado	125
7.- Conclusiones	129
8.- Recomendaciones	131
9.- Bibliografías	132
Apéndice 1	136
Apéndice 2	140
Apéndice 3	142
Apéndice 4	148
Apéndice 5	153

Acrónimos

INDICE DE FIGURAS

Figura

1.- Esquema del dispositivo comercial de MEFS	11
2.- Estructura química de algunos de los recubrimientos de fibras para MEFS	13
3.- Clasificación de la fibra MEFS según si la extracción se produce por absorción y adsorción	15
4.- Proceso de sorción y desorción de la fibra para ID-MEFS y EC-MEFS	18
5.-Variación con el tiempo de la cantidad de analito retenida por la fibra en MEFS	20
6.- Diagrama de un cromatógrafo de gases	25
7.- Inyector de muestra para un CG	28
8.- Sistema de Inyección par CG	28
9.- Columna de relleno	30
10.- Columna capilar	31
11.- Columnas tubulares abiertas WCOT y SCOT	32
12.- Columna tubular abierta FSOT	32
13.- Detector de ionización de llama (FID, Flame Ionization Detector)	37
14.- Detector de conductividad térmica (TCD, Thermal Conductivity Detector)	38
15.- Equipo de cromatografía de gases y equipo computarizado con el sistema de adquisición de datos.	49

16.- Fibras de 7 y 30 μm PDMS y de 65 μm PDMS-DVB, con su respectivo contenedor para la fibra: Holder MEFS para análisis por CG (SUPELCO)	51
17.- Muestra sintética (A), obtenida por EC-MEFS-CG, con la fibra de 30 μm de PDMS.	59
18.- Muestra sintética (B), obtenida por EC-MEFS-CG, con la fibra de 65 μm de PDMS-DVB	62
19.- Inyección directa al cromatógrafo de gases de 10 μL de aire tomado del ambiente con la jeringa.	63
20.- Normalización de áreas Vs Patrón de HAPs (muestras A y B)	65
21.- Inyección directa al cromatógrafo de gases de 10 μL del multipatrón concentrado de 400 ppm	69
21-A. Inyección directa al cromatógrafo de gases de 10 μL del multipatrón concentrado de 400 ppm (ampliación), rango de tiempo (3,30 – 5,73) min	70
21-B. Inyección directa al cromatógrafo de gases de 10 μL del multipatrón concentrado de 400 ppm (ampliación), rango de tiempo (6,00 – 12,00) min	71
21-C. Inyección directa al cromatógrafo de gases de 10 μL del multipatrón concentrado de 400 ppm (ampliación), rango de tiempo (13,50 – 20,00) min	72
22.- Cromatógrama obtenido por Moreira Vaz, J	73
23.- Silica + multipatrón (sin homogeneizar) obtenida por EC-MEFS-CG, con la fibra de 65 μm de PDMS-DVB	74
24.- Silica + multipatrón (Homogeneización), obtenida por EC-MEFS-CG, con la fibra de 65 μm de PDMS-DVB	75
25.- Silica + multipatrón de referencia, condiciones de Moreira Vaz ^[40] (Escala ampliada), obtenido por EC-MEFS-CG, con la fibra de 65 μm de PDMS-DVB.	80

26.- Inyección directa de 2 μ L de acetonitrilo (Escala ampliada)	81
27.- Sangrado de la columna + posibles contaminantes presentes.	82
28.- Inyección directa al cromatógrafo de gases de 2 μ L de Benzo(a) pireno	83
29.- Criseno disuelto en mezcla acetonitrilo/acetato de etilo.	84
30.- Pireno disuelto en mezcla acetonitrilo/acetato de etilo.	85
31.- Muestra sintética D, obtenido por EC-MEFS-CG, con la fibra de 65 μ m de PDMS-DVB.	88
32.- Hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en el mutipatrón de 400 ppm, obtenido por EC-MEFS-CG con la fibra de 65 μ m de PDMS-DVB.	90
32-A. Hidrocarburos aromáticos policiclicos presentes en el mutipatrón de 400 ppm, sorbidas por la fibra de 65 μ m de PDMS-DVB (Rango de tiempo (2,00 – 8,50) min).	91
33.-Silica + multipatrón 20 ppm obtenidos por ID-MEFS-CG con la fibra de 65 μ m de PDMS-DVB, programación de temperatura empleada por Mendoza, K.	93
34.-Silica + multipatrón de 400 ppm, obtenido por ID-MEFS-CG con la fibra de 65 μ m de PDMS-DVB (Homogeneización)	94
35.-Inyección directa al cromatógrafo de gases de 20 μ L de muestra remanente.	96
36.- Homogeneización de silica + mezcla de patrones puros (IV) + disolución de criseno, obtenido por ID-MEFS-CG con la fibra de 65 μ m de PDMS-DVB.	97
37.-Inyección directa al cromatógrafo de gases de 20 μ L de la solución remanente	98
38-A. Área de naftaleno vs Temperatura	101
38-B. Área de fluoreno vs Temperatura	101
38-C. Área de antraceno vs Temperatura	102

38-D. Área de pireno vs Temperatura	102
38-E. Área de criseno vs Temperatura	102
39-A. Área de naftaleno vs Tiempo	106
39-B Área de fluoreno vs Tiempo	106
39-C. Área de antraceno vs Tiempo	106
39-D. Área de pireno vs Tiempo	106
40.- EC-MEFS-CG/Muestra de trigo TSRW	112
41.- ID-MEFS-CG/Muestra de trigo TSRW	113
42.- Comparación áreas EC-MEFS-CG / ID-MEFS-CG muestra de trigo TSRW	114
43.- EC-MEFS-CG/Muestra de trigo HRW	115
44.- ID-MEFS-CG/Muestra de trigo HRW	116
45.- Comparación áreas EC-MEFS-CG / ID-MEFS-CG muestra de trigo HRW.	117
46.- EC-MEFS-CG/Muestra de maíz amarillo	119
47.- ID-MEFS-CG/Muestra de maíz amarillo	120
48.-Comparación áreas EC-MEFS-CG / ID-MEFS-CG muestra de maíz amarillo	121
49.- EC-MEFS-CG/Muestra de maíz blanco	122
50.- ID-MEFS-CG/Muestra de maíz blanco	123
51.- Comparación de áreas EC-MEFS-CG / ID-MEFS-CG muestra de maíz blanco	124
52-A. Área de naftaleno Vs Experiencia	127
52-B. Área de antraceno Vs Experiencia	127

52-C. Área de Pireno Vs Experiencia	127
A.1-1. Muestra de patrones puros (I), obtenida por EC-MEFS-CG, con la fibra de 65µm de PDMS-DVB.	137
A.1-2. Limpieza de la fibra de 65 µm de PDMS-DVB.	138
A.1-3. Silica + multipatrón de referencia + muestra sintética (C), obtenida por EC-MEFS-CG, con la fibra de 65 µm de PDMS-DVB.	139
A.2-1. Isoterma de Langmuir. Tipo I (monocapa).	141
A.3-1. Experiencia 1 temperatura 35 °C	143
A.3-2. Experiencia 2 temperatura 45 °C	144
A.3-3. Experiencia 3 temperatura 55 °C	145
A.3-4. Experiencia 4 temperatura 65 °C	146
A.3-5. Experiencia 5 temperatura 75 °C	147
A.4-1. Experiencia 1, Tiempo 40 min.	149
A.4-2. Experiencia 2, Tiempo 50 min.	150
A.4-3. Experiencia 3, Tiempo 60 min.	151
A.4-4. Experiencia 4, Tiempo 70 min.	152
A.5-1. Repetitividad muestra 1 de maíz blanco por EC-MEFS-CG, empleando la fibra de 65 µm de PDMS-DVB.	154
A.5-2. Repetitividad muestra 2 de maíz blanco por EC-MEFS-CG, empleando la fibra de 65 µm de PDMS-DVB.	155
A.5-3. Repetitividad muestra 3 de maíz blanco por EC-MEFS-CG, empleando la fibra de 65 µm de PDMS-DVB.	156

A.5-4. Repetitividad muestra 4 de maíz blanco por EC-MEFS-CG, empleando la fibra de 65 μm de PDMS-DVB. 157

INDICE DE TABLAS

Tabla

1.- Los 16 HAPs seleccionados por la Agencia Federal para la Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos	7
2.- Características de los 16 HAPs seleccionados por la Agencia Federal para la Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos.	8
3.- Tipo de fibras comercializado para MEFS (uso y propiedades)	16
4.- Fases estacionarias comunes y aplicaciones	34
5.- Características del equipo cromatográfico que se empleará	50
6. Condiciones iniciales y finales empleadas en el cromatógrafo de gases.	56
7. Programación de temperaturas inicial y final empleadas ^[18] .	57
8. Proporciones de los patrones puros empleados para elaborar la mezcla (I)	58
9 Concentración de los HAPs contenidos en la muestra sintética A (producto de homogeneizar 0,0200 g de la mezcla (I) con 0,9800 g de silica).	58
10. Resultados obtenidos para la muestra sintética (A), empleando la fibra de 30 µm de PDMS.	59
11. Proporciones de los patrones puros empleados para elaborar la mezcla (II)	60
12 Concentración de los HAPs contenidos en la muestra sintética B (producto de homogeneizar 0,0100 g de la mezcla de patrones puros con 0,9900 g de silica).	61
13 Resultados Obtenidos para la muestra sintética (B), empleando la fibra de 65 µm de PDMS-DVB.	61

14. Resultados obtenidos para la normalización de áreas empleando las muestras sintéticas A y B.	64
15. Hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en el multipatrón de referencia (CUS-9735, Ultra Scientific)	68
16 Cantidad inyectada de los HAPs en estudio en 100 μ L del estándar de 20 ppm.	74
17. Comparación de áreas (silica + multipatrón), sin homogeneizar y con homogeneización.	76
18. Proporciones de los patrones puros empleados para elaborar la mezcla (III)	77
19 Concentración de los HAPs contenidos en la muestra sintética C.	77
20. Comparación de áreas (silica + multipatrón) y (silica + multipatrón + mezcla (III)).	78
21. Programación de temperatura empleada por Moreira Vaz, J.	79
22. Condiciones de sorción y desorción por EC-MEFS-CG.	82
23. Proporciones de los patrones puros empleados para elaborar la mezcla (IV).	86
24. Concentración de los HAPs contenidos en la muestra sintética D (producto de homogeneizar 0,0100 g de la mezcla (IV) con 0,9900 g de silica).	87
25. Resultados obtenidos para la muestra sintética (D), empleando la fibra de 65 μ m de PDMS-DVB.	87
26 Cantidad inyectada de los HAPs en estudio en 20 μ L del estándar de 400 ppm.	89
27 Cantidad inyectada de los HAPs en estudio en 50 μ L del estándar de 400 ppm.	95
28. Concentración de los HAPs contenidos en la muestra sintética E (producto de homogeneizar 0,0100 g de la mezcla (IV) + 0,2900 g de silica + 20 μ L de una disolución de criseno).	100

29. Resultados de las áreas vs temperatura del baño de glicerina con tiempo de sorción de 60 min.	101
30. Proporciones de los patrones puros empleados para elaborar la mezcla (V)	103
31. Concentración de los HAPs contenidos en la muestra sintética (F) (producto de homogeneizar 0,0100 g de la mezcla (V) con 0,2900 g de silica).	104
32. Resultados de las áreas Vs tiempo de sorción, para 65 °C del baño de glicerina	105
33. Solvente y volumen de extracción, condiciones de sorción y desorción para ID-MEFS-CG	108
34. Cuadro comparativo entre EC-MEFS-CG e ID-MEFS-CG.	109
35. Comparación de áreas EC-MEFS-CG / ID-MEFS-CG muestra de trigo TSRW	114
36. Comparación de áreas EC-MEFS-CG / ID-MEFS-CG muestra de trigo HRW.	117
37. Comparación de áreas EC-MEFS-CG / ID-MEFS-CG muestra de maíz amarillo	121
38. Comparación de áreas EC-MEFS-CG / ID-MEFS-CG muestra de maíz blanco	124
39. Repetitividad de la técnica para el naftaleno	125
40. Repetitividad de la técnica para el antraceno	126
41. Repetitividad de la técnica para el pireno	126

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: “**ESTUDIO DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DE LOS HAPs EN MUESTRAS DE CEREALES Y SU ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES**” Presentado por el Br. Reinaldo Rafael Mujica Pérez, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

Dr. Andrés Escalona

(Director)

Dra. Rosa Amaro

(Director)

Dr. Federico Galarraga

(Jurado)

Dr. Jaime Valls

(Jurado)

Yo Profesor Andrés Escalona, Investigador del Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y la Profesora Rosa Amaro, Investigadora del Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“ESTUDIO DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DE LOS HAPs EN MUESTRAS DE CEREALES Y SU ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES”.

Que presenta el Br. Reinaldo Rafael Mujica Pérez, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2009 y 2010, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, 02 de noviembre del 2010

Dr. Andrés Escalona

Dra. Rosa Amaro

A la memoria de mi padre, hermana y abuela...

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a Dios por ser mi guía día a día y brindarme las fuerzas necesarias especialmente en este último año, para él toda la gloria contigo siempre se gana y nunca se pierde.

A mi padre Dr. Jesús Rafael Mujica, a mi hermana abogada Celimar del Valle Mujica Pérez (mi gordi) y a mi abuela Flor de Pérez por brindarme todo su apoyo durante la carrera, estén donde estén los llevaré en mi recuerdo por siempre.

A mi madre Celia María Pérez de Mujica y a mis hermanos Jesús Rafael, René Antonio y Jesús Antonio Mujica Pérez por estar siempre conmigo brindándome todo el apoyo necesario para culminar esta meta.

A la Universidad Central De Venezuela por abrirme sus puertas y poder formarme en ella no sólo en lo académico y deportivo sino en todo los aspectos que se puedan imaginar.

A los directores del presente trabajo especial de grado, Dra. Rosa Amaro y Dr. Andrés Escalona por su paciencia y dedicación durante la realización del mismo.

A la Lic. Felicia Contreras de la UDO, por la colaboración prestada.

A Iglamar Fajardo (mi reina bella) por estar a mi lado en las buenas y malas.

A mi sensei Lic. David Ochoa por colocar su confianza en mí a la hora de ingresar a esta magna casa de estudio.

Al personal de Centro de Química Analítica, en especial al Prof. Gustavo Pérez, por todos los consejos y enseñanzas proporcionadas.

A la Prof. Marylorena Araujo, José Sánchez, Emiselys Duarte, Jhonatan Chourion, Diego Lozada, Manuel Matos, Jairo Bermúdez, Josué Belmonte, Pedro, y muchos más por toda la ayuda prestada.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la Microextracción en Fase Sólida de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), empleando las técnicas de Espacio confinado (EC-MEFS) e Inmersión Directa (ID-MEFS), empleando como sistema de sorción un baño de glicerina, con una fibra de Polidimetilsiloxano-Divinilbenceno (PDMS-DVB) de 65 μm de espesor y como sistema de desorción y detección un Cromatógrafo de Gases con un Detector de Ionización a la Llama (GC-FID). Entre las variables optimizadas tenemos la fibra empleada en la cual se compararon las de 30 μm (PDMS) y la de 65 μm (PDMS-DVB), siendo ésta última la que arrojó mejores resultados. Para el caso de la etapa de sorción de la técnica de ID-MEFS se optimizó la temperatura del baño de glicerina y el tiempo de sorción de la fibra, siendo 65 °C y 40 min respectivamente los valores óptimos obtenidos. Se estudió además el multipatrón de referencia (CUS-9735, Ultra Scientific), el cual posee 25 HAPs de ellos los 16 seleccionados por la Agencia Federal para la Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos, encontrándose que las condiciones empleadas son capaces de detectar hasta 11 de ellos: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo[b]fluoranteno y benzo[k]fluoranteno, asimismo la técnica de EC-MEFS puede detectar los 9 primeros si estos se encuentran en una cantidad adecuada para ser sorbidos por la fibra.

Se evaluaron 4 tipos de muestras las cuales fueron 2 tipos de trigo: TSRW y HRW así como 2 tipos de maíz: Amarillo y blanco; encontrándose que para estas últimas se lograron identificar los siguientes HAPs: Naftaleno, Fluoreno, Antraceno y Pireno, por ambas técnicas empleadas, en cambio para las primeras muestras sólo se logró detectar la presencia de estos hidrocarburos por la técnica de EC-MEFS.

1. INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), constituyen un grupo de compuestos químicos que se les han demostrado sus propiedades cancerígenas. Adicionalmente se ha comprobado en diferentes estudios a lo largo del tiempo, que los seres humanos no sólo están expuestos a estos agentes a través del aire o la ingesta de agua potable, sino también por el consumo de alimentos contaminados con los mismos, por lo que diversos organismos internacionales se han concentrados en estudiarlos y minimizar su impacto en la salud.^[1]

La nueva legislación de la Unión Europea (UE), presentó una solución a principios de 2005, a los problemas de contaminación de alimentos sobre la base de datos recogidos de los estados miembros y de la evaluación realizada por el Comité Científico de la Alimentación (SCF) en 2002. Este Comité evaluó 33 HAPs y de estos identificó 15 que poseen propiedades genotóxicas y cancerígenas, además indicaron que el benzo (a) pireno (BaP), podría utilizarse como un marcador de los HAPs, a pesar de que éste, sólo constituye del 1 al 20 % de la concentración total de HAPs cancerígenos. El estudio del benzo (a) pireno (BaP) data de la década de los 70 en donde se publicó su primer método oficial de análisis en alimentos que se basó en la absorción de rayos ultravioleta de un extracto del alimento que previamente es purificado por cromatografía en capa fina.^[1]

En base a lo anteriormente expuesto y a los estudios realizados por la comunidad científica, en abril del 2005 se propuso un límite máximo residual (LMR) de 1,0 µg/Kg de (BaP) en los alimentos para lactantes y niños pequeños (incluidos los alimentos a base de cereales) y quedó establecido en el Reglamento de la Comisión de las Comunidades Europeas el 19 de diciembre del 2006, bajo el nº 1881/2006.^[2]

Aunque actualmente se ha centrado el estudio, al benzo (a) pireno (BaP), se ha continuado las evaluaciones del resto de HAPs en muestras de alimentos muy

especialmente en los últimos 5 años y el método más empleado para esto ha sido la cromatografía de gases debido a su gran sensibilidad.

Una técnica que está iniciando su aplicación con gran fuerza en la determinación de HAPs en alimentos, pero que ya tiene gran desarrollo en otros tipos de muestras, es la microextracción en fase sólida (MEFS), dado que elimina la mayoría de los inconvenientes que puedan presentar otras técnicas, incluyendo altos costos y tiempos de preparación excesiva de muestra. La MEFS ha sido una técnica tan versátil que ya desde sus inicios, mostraba su avances cuando fue galardonada en 1994, con el premio R&D 100 a la Tecnología Innovadora. ^[3]

En este trabajo se propone evaluar la microextracción en fase sólida (MEFS), para el estudio de HAPs en cereales.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) son compuestos que contienen carbono e hidrógeno en estructuras aromáticas. Sólo algunos de ellos, como el antraceno y el pireno, se producen industrialmente, pero estos como tal, se encuentran de forma natural en numerosos materiales orgánicos fósiles y pueden originarse, cuando se produce la combustión incompleta, a temperaturas elevadas.^[4] Estos compuestos son contaminantes que se encuentran prácticamente en todas partes. Su presencia en el medio ambiente generalmente, es producida de manera natural ejemplo: Incendios forestales o de manera antropogénica ejemplo: Combustión en automóviles.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) están formados por dos, tres o más anillos aromáticos condensados, estos pueden estar en línea recta, angulados o ramificados. Además, el término hidrocarburo indica que la molécula contiene sólo carbono e hidrógeno. La estructura condensada más sencilla, formada por sólo dos anillos aromáticos, es el naftaleno.

Los HAPs, son sólidos a temperatura ambiente. Dependiendo de su carácter aromático, los HAPs absorben luz ultravioleta y producen un espectro fluorescente característico. Son solubles en disolventes orgánicos como: Tolueno, acetona, ciclohexano, metanol o tetrahidrofurano, pero muy poco solubles en agua y su solubilidad en esta decrece al aumentar el peso molecular y tamaño de la molécula.

Desde el punto de vista químico, los HAPs reaccionan por sustitución del hidrógeno o por adición cuando se produce su saturación. Generalmente se conserva el sistema de anillos. La mayoría se fotooxidan, una reacción importante para eliminarlos de la atmósfera.

Los HAPs reaccionan rápidamente con óxidos de nitrógeno o HNO_3 . Por ejemplo, el antraceno puede oxidarse a antraquinona por acción del HNO_3 o dar un derivado nitrogenado mediante una reacción de sustitución con NO_2 . Los HAPs pueden reaccionar con SO_2 , SO_3 y H_2SO_4 para formar ácidos sulfínico y sulfónico.^[5]

Además pueden incorporarse al organismo por ingestión, inhalación o absorción dérmica, por lo que son considerados liposolubles. Como consecuencia de su baja solubilidad en agua y elevada en sustancias de naturaleza lipídica, se acumulan en los organismos, en la materia orgánica y sedimentos, pudiendo permanecer así largos periodos de tiempo garantizando su biodisponibilidad. La lentitud con que son degradados estos compuestos provoca su acumulación en plantas, peces e invertebrados acuáticos y terrestres, incorporándose, por lo tanto, a la cadena alimentaria.^[6]

Entre los HAPs se encuentran cientos de compuestos que han sido objeto de gran atención por ser muchos de ellos cancerígenos, especialmente los HAPs que contienen entre cuatro y seis anillos aromáticos. El hecho de que los HAPs cancerígenos reaccionen con otras sustancias no significa necesariamente que se inactiven como tales; por el contrario, muchos HAPs que contienen sustituyentes son carcinógenos más potentes que el correspondiente compuesto progenitor.

Son compuestos cancerígenos cuyos efectos se activan por medio de una enzima, el citocromo P450, presente en el hígado. Esta enzima metaboliza el tolueno y otras sustancias xenobióticas (moléculas extrañas al organismo). La enzima incorpora oxígeno a la estructura del HAPs, originando aductos tipo epóxidos, que reaccionan fácilmente con las bases heterocíclicas del ADN, alterando los genes.^[7]

La referencia histórica más antigua sobre los HAPs, nos remonta de 1775, cuando un médico inglés, Sir Percival Pott, describió por primera vez un cáncer de origen profesional. Asoció el cáncer de escroto de los deshollinadores con su prolongada exposición a alquitrán y hollín, en condiciones deficientes de higiene

personal. Cien años más tarde se describió el cáncer de piel en los trabajadores expuestos a alquitrán o aceites bituminosos. En el decenio de 1930 se describió el cáncer de pulmón en los trabajadores de la industria del acero y en la del coque. A finales del decenio de 1910 se definió el desarrollo experimental de cáncer de pulmón en animales de laboratorio tras la aplicación repetida de alquitrán de hulla. En 1933 se demostró que un hidrocarburo aromático cíclico aislado del alquitrán de hulla era cancerígeno. El compuesto aislado resultó ser benzo(a)pireno. Desde entonces se han descrito cientos de HAPs cancerígenos. Los estudios epidemiológicos indican una mayor frecuencia de cáncer de pulmón en los trabajadores de las industrias de coque, aluminio y acero. Aproximadamente un siglo después se han regulado algunos de los HAPs como cancerígenos laborales.^[8]

Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) tienen una amplia distribución en el medio ambiente. Se ha estimado que la ingesta humana de los HAPs en los alimentos es considerablemente más elevada que la del aire en el ambiente o el agua que bebemos. Los aceites y grasas comestibles son las fuentes que contribuyen más a causa de su naturaleza lipofílica.^[6]

Más de 100 HAPs se han encontrado en la naturaleza, sin embargo, sólo 16 han sido seleccionados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) (Tabla 1), sobre la base de su ocurrencia y efecto cancerígeno.^[4]

La única manera de saber que los productos químicos y la cantidad de ellos están en los alimentos es a través de análisis químico. Sólo entonces podemos saber las necesidades nutricionales para los diferentes productos químicos o de sus efectos sobre la salud. A través de la capacidad de identificar y cuantificar los componentes en los alimentos, la química analítica ha desempeñado un papel importante en el desarrollo humano, y la cromatografía, en particular, ha sido fundamental para la separación de muchos compuestos orgánicos en los alimentos.^[9]

La EPA ha sugerido el Método 8310, para la determinación de los 16 HAPs cancerígenos ^[10].

Este método es empleado, para determinar la concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), en aguas subterráneas y residuos, mediante (HPLC), ya que, proporciona un alto rendimiento en las condiciones para la detección de los mismos, a nivel de los ppb.

Este método sugiere que una extracción adecuada proviene de una alícuota de entre (5 – 25) μL , la cual se debe inyectar en un HPLC, y ser detectados por (UV) y/o por fluorescencia.

La sensibilidad de este método por lo general depende del nivel de interferencias en lugar de las limitaciones instrumentales. ^[11]

Tabla N° 1. Los 16 HAPs seleccionados por la Agencia Federal para la Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos. ^[4]

HAPs	Estructura	Presión de vapor (Torr)	Solubilidad en agua (mg·L ⁻¹)	P	Potencial cancerígeno IARC US/US EPA ¹
1. Naftaleno, N		492	32	2300	-
2. Acenaftileno, Aci		10 ⁻³ -10 ⁻² a 20 °C	393	12000	-
3. Acenafteno, Ace		10 ⁻³ -10 ⁻² a 20 °C	3.4 a 25 °C	21000	-
4. Fluoreno, Fl		10 ⁻³ -10 ⁻² a 20 °C	19	15000	-
5. Fenantreno, Fe		6.8·10 ⁻⁴ a 20 °C	1.0-1.3 a 25 °C	29000	3
6. Antraceno, A		2·10 ⁻⁴ a 20 °C	0.05-0.07 a 25 °C	28000	3
7. Fluoranteno, Ft		10 ⁻⁶ a 10 ⁻⁵ a 20°C	0.26 a 25 °C	340000	3
8. Pireno, P		6.9·10 ⁻³ a 20 °C	0.14 a 25 °C	2·10 ⁵	3
9. Benzo(a)antraceno, B(a)A		5.9·10 ⁻³ a 20 °C	0.01 a 25 °C	4·10 ⁵	2A/B2
10. Criseno, Cr		10 ⁻¹¹ a 10 ⁻⁶ a 20 °C	--	4·10 ⁵	3/B2
11. Benzo(b)fluoranteno, B(b)Ft		10 ⁻¹¹ a 10 ⁻⁶ a 20 °C	--	4·10 ⁴	2B/B2
12. Benzo(k)fluoranteno, B(k)Ft		9.6·10 ⁻⁷ a 20 °C	0.0038 a 25 °C	7·10 ⁴	2B
13. Benzo(a)pireno, B(a)P		5·10 ⁻⁹	0.0005 a 25 °C	106	2A/B2
14. Dibenzo(a,h)antraceno, diB(a,h)A		• 10 ⁻¹¹	0.00026 a 25 °C	106	2A/B2
15. Benzo(ghi)perileno, B(ghi)Per		• 10 ⁻¹¹	--	107	3
16. Indeno(1,2,3-cd)pireno, I(1,2,3-cd)P		• 10 ⁻¹¹	--	5·10 ⁷	2B/B2

2A: probablemente cancerígeno en humanos. 2B: posiblemente cancerígeno en humanos. 3: no calificable como cancerígeno en humanos

-: no experimentado en humanos

¹IARC: Agencia Internacional en la Investigación del Cáncer.

Tabla N° 2 Características de los 16 HAPs seleccionados por la Agencia Federal para la Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos. ^[12 y 13]

HAPs	Estructura	Peso molecular (g/mol)	Punto de ebullición (°C)	CAS No.
Naftaleno		128,1705	218	91-20-3
Acenaftileno		152,1919	280	208-96-8
Acenafteno		154,2078	279	83-32-9
Fluoreno		166,2185	298	86-73-7
Fenantreno		178,2292	340	85-01-8
Antraceno		178,2292	340	120-12-7
Fluoranteno		202,2506	384	206-44-0
Pireno		202,2506	404	129-00-0
Benzo(a)antraceno		228,2879	438	56-55-3
Criseno		228,2879	448	218-01-9
Benzo(b)fluoranteno		252,3093	N.A	205-99-2
Benzo(k)fluoranteno		252,3093	N.A	207-08-9
Benzo(a)pireno		252,3093	495	50-32-8
Dibenzo(a,h)antraceno		278,3466	524	53-70-3
Benzo(ghi)perileno		276,3307	> 500	191-24-2
Indeno(1,2,3-cd)pireno		276,3307	N.A	193-39-5

2.2. Microextracción en fase sólida (MEFS).

La MEFS constituye una técnica de pre-tratamiento de muestras bastante utilizada en la actualidad. Desarrollada en 1990 por Pawliszyn, para el análisis de compuestos orgánicos volátiles, se ha convertido en una técnica rutinaria en muchos laboratorios. Desde su aparición, la MEFS ha jugado un papel importante en el análisis medioambiental. ^[11]

La MEFS (ver figura 1), se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de una fina película, de 10 a 100 μm , de un líquido no volátil, semejante a las fases estacionarias empleadas en cromatografía de gases, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico. El pequeño tamaño de ésta y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa. De esta forma, se facilita su manipulación y al mismo tiempo se protege la misma cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa. Posteriormente la fibra puede emerger de la aguja y exponerse a la disolución de la muestra (o al espacio libre sobre un líquido) durante un tiempo, mientras se agita, y si conviene también calentando. Lo mejor es determinar experimentalmente cuanto tiempo se necesita para que ésta se sature con el analito, y prolongar la extracción durante ese tiempo. Si se acorta el tiempo de extracción, probablemente la concentración de analito en la misma variará de muestra a muestra. Aun cuando se alcance el equilibrio, en la fibra sólo se extrae una fracción del analito que hay en la muestra. Cuando se extrae del espacio confinado la muestra líquida debe ocupar $\sim 2/3$ del vial. Demasiado volumen del espacio confinado reduce la eficacia de la extracción. ^[14 y 15]

Una vez tomada la muestra, se repliega la fibra y se introduce la aguja dentro de un cromatógrafo de gases. Se saca la misma dentro de la guía caliente del inyector, en cuyo interior el analito se desorbe térmicamente de la fibra, y se introduce sin división de flujo durante un tiempo fijo. ^[14 y 15]

2.2.1. Ventajas de la MEFS

- Es simple.
- Presenta un relativo bajo costo
- Puede ser automatizada
- Requiere pequeños volúmenes de muestra
- Generalmente no precisa del uso de disolventes orgánicos para llevar a cabo la preconcentración, a diferencia de la extracción líquido-líquido y la extracción en fase sólida
- Debido a su diseño, es fácilmente transportable por lo que la hace una técnica muy adecuada para realizar análisis de campo
- Se puede aplicar a la determinación de compuestos de diferente volatilidad.

2.2.2. Desventaja de la MEFS

Debido a la limitada capacidad de las fibras (la cantidad de recubrimiento es muy pequeña) en ocasiones no se obtienen bajos límites de detección, sobre todo si la MEFS se utiliza combinada con la cromatografía de líquidos.^[16]

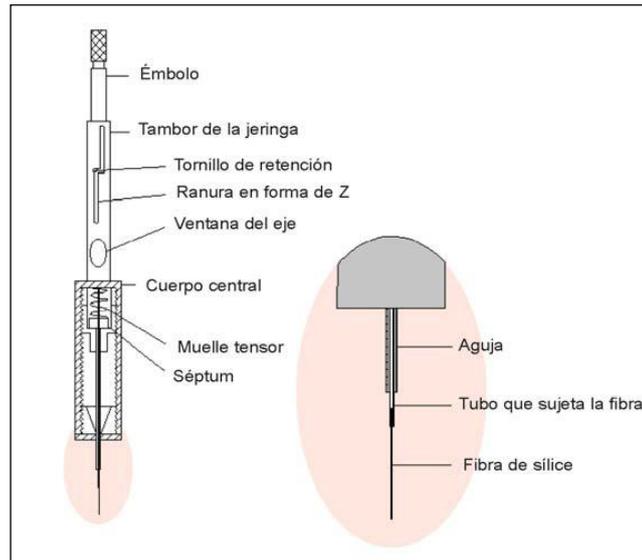


Figura N° 1. Esquema del dispositivo comercial de MEFS. ^[14]

2.2.3. Fundamentos teóricos de la MEFS

El principio en que se basa la MEFS, es la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de fibra. ^[16] Así, el transporte de los analitos desde la matriz hasta ésta, comienza cuando la fibra entra en contacto con la muestra, por lo que la extracción se considera completa cuando la concentración de analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre ambas.

De lo dicho anteriormente, existen dos modos de extracción posibles en MEFS, introduciendo la fibra directamente en la muestra o bien en el espacio confinado o headspace. Para explicar la dinámica del proceso de sorción cuando ésta se introduce directamente en la muestra, Louch y col ^[14] desarrollaron un modelo matemático que confirma la relación lineal que existe entre la cantidad de analito sorbida por la misma en el estado de equilibrio y la concentración de este en la muestra. Esta afirmación se muestra reflejada en la siguiente ecuación:

$$n_f = (K_{fs}V_fC_sV_s)/(K_{fs}V_f + V_s) \quad \text{Ec (1)}$$

n_f : Moles de analito sorbidos por la fibra.

V_f : Volumen de fibra.

V_s : Volumen de muestra.

K_{fs} : Coeficiente de partición del analito entre la fibra y la muestra.

C_s : Concentración inicial del analito en la muestra.

En la ecuación (1) se asume que la matriz de la muestra es una única fase homogénea y no se considera el efecto del espacio confinado. En las condiciones de trabajo de la MEFS, generalmente se cumple que $V_s \gg K_{fs}V_f$ ya que en la mayoría de los casos V_f es mucho más pequeño que V_s por lo que la ecuación (1) se transforma en la siguiente:

$$n_f = K_{fs}V_fC_s \quad \text{Ec (2)}$$

Conociendo que K_{fs} y V_f , son constantes, $K_{fs}V_f = A$, obtenemos lo siguiente:

$$n_f = AC_s \quad \text{Ec (3)}$$

Es decir la cantidad de analito extraída, es directamente proporcional a la concentración del analito en la muestra e independiente del volumen de muestra.

El modelo matemático del proceso de MEFS cuando los analitos se extraen del espacio confinado fue desarrollado posteriormente y las ecuaciones y conclusiones a las que se llega son similares a las de la extracción por inmersión pero teniendo en cuenta una tercera fase gaseosa.

$$n_f = (K_{fs}V_fC_sV_s)/(K_{fs}V_f + K_{ec}V_{ec} + V_s) \quad \text{Ec (4)}$$

V_{ec} : Volumen del espacio confinado.

K_{ec} : Coeficiente de partición del analito entre la muestra y el espacio confinado.

En MEFS también se debe tener en cuenta la cinética del proceso ya que los analitos deben ser transportados desde la matriz de la muestra a la fibra en inmersión o desde la matriz de la muestra al espacio confinado y de allí hacia la fibra, en el caso de que la extracción se realice mediante extracción del espacio confinado de la muestra (EC-MEFS). Para aumentar la velocidad de la extracción es necesario utilizar un sistema de agitación de manera que se facilite la difusión de los analitos hacia la superficie de la fibra. Esto no es necesario con muestras gaseosas ya que la propia convección del aire es suficiente para llegar al equilibrio de forma rápida. ^[16 y 18]

2.2.4. Tipos de fibras en MEFS

Actualmente hay fibras con diferentes recubrimientos, la estructura de algunos de estos pueden observarse en la (figura n° 2), de manera que la MEFS puede usarse para determinar un amplio grupo de compuestos. Los primeros que fueron comercializados son los de polidimetilsiloxano (PDMS) y poliácido (PA) pero estos han ido aumentando progresivamente y actualmente cubren un amplio conjunto de aplicaciones (ver tabla n° 2).

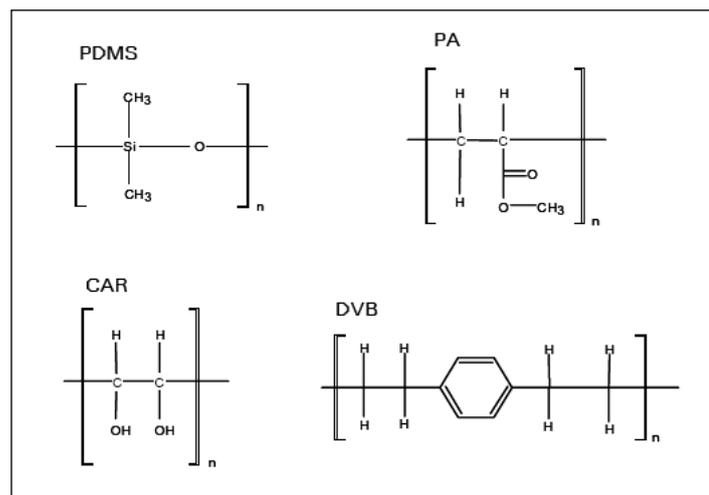


Figura N° 2. Estructura Química de algunos recubrimientos de fibras para MEFS. ^[14]

Además de las fibras comerciales, algunos autores han fabricado otros recubrimientos para aplicaciones más específicas, como por ejemplo los de carbón C_8, C_{18} , polipirrol o incluso algunas recubiertas con polímeros de huella molecular (MIPs), de manera que se consiguen con una gran variedad o muy selectivas para un determinado compuesto. También se han desarrollado, recubrimientos que permiten la extracción de compuestos organometálicos o compuestos inorgánicos, que son difícilmente extraídos con las fibras comerciales. Generalmente, la naturaleza del analito determina la que se empleará en cada caso. En general, se utilizan las recubiertas por sustancias polares como: Poliacrilato (PA) o carbowax (CW), para analitos polares como fenoles y las apolares como PDMS para determinar, analitos apolares como PAHs o BTEX (benceno, tolueno, xileno y etilbenceno).^[14 y 16]

Las fibras de PDMS, constituidas por un polímero líquido, son las más utilizadas ya que fueron las primeras en ser introducidas para la MEFS. Estas son las más adecuadas para los analitos apolares aunque, en algunos casos, también pueden ser usadas para la determinación de analitos con cierta polaridad. La afinidad de los analitos por el PDMS puede ser estimada a partir de los tiempos de retención de los compuestos en las columnas de PDMS ya que el polímero que compone las fibras y las columnas capilares es básicamente el mismo. Las de PDMS se comercializan en diferentes espesores (100 μm , 30 μm y 7 μm). En general, se recomienda utilizar las de mayor espesor, como la de 100 μm , para compuestos con coeficientes de partición bajos y de poco espesor para los que presenten coeficientes de partición elevados. La reducción del espesor de éstas de 100 μm a 7 μm limita su aplicación a un número reducido de analitos pero permite trabajar a mayores temperaturas, lo que extiende su aplicación a compuestos con temperaturas de ebullición más elevadas.^[14]

En general, los compuestos volátiles requieren un polímero más denso que otros compuestos menos volátiles. Con estos polímeros más densos, el proceso es de adsorción (ver figura nº 3), ya que los analitos quedan en la capa superficial del polímero. Además, las fibras con rellenos más densos requieren más tiempo para

alcanzar el equilibrio de sorción pero tienen mayor sensibilidad. En el caso de que el polímero sea menos denso, los analitos penetran también en los poros de éste, produciendo un proceso de absorción y adsorción simultáneamente. Por este motivo, es habitual encontrar en la bibliografía ambos términos, razón por la cual se usa el término “Sorción” que los resume.

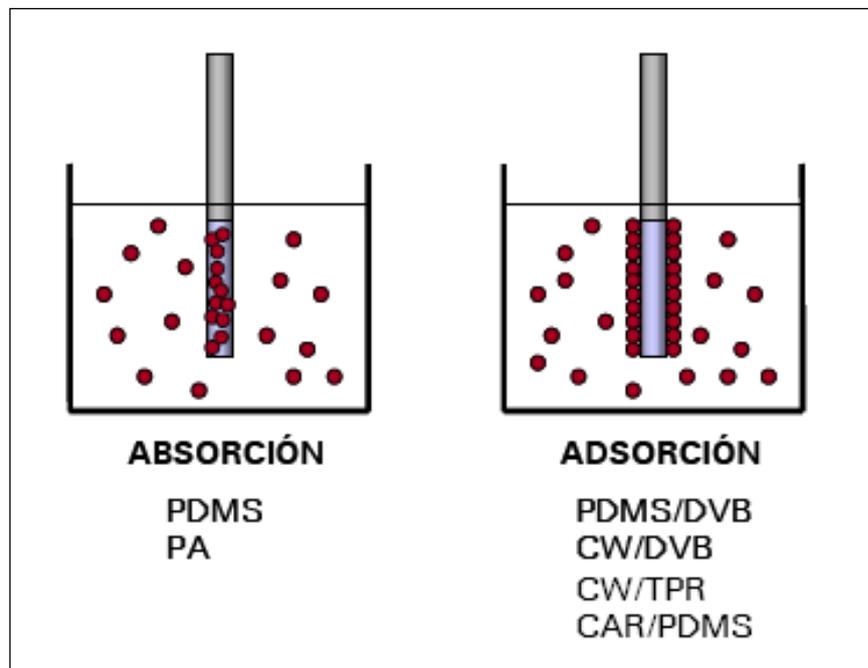


Figura N° 3. Clasificación de la fibra de MEFS según si la extracción se produce por absorción o adsorción. ^[14]

Tabla N° 3. Tipos de fibra comercializados para MEFS (usos y propiedades).^[14]

Fase estacionaria / espesor	T ² máxima de uso	Polaridad	Uso recomendado
Polidimetilsiloxano (PDMS)			
100 μm , fase no enlazada	280 °C	No polar	GC/HPLC
30 μm , fase no enlazada	280 °C	No polar	GC/HPLC
7 μm , fase enlazada	340 °C	No polar	GC/HPLC
Polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB)			
65 μm , fase parcialmente entrecruzada	270 °C	Bipolar	GC
60 μm , fase parcialmente entrecruzada	-	Bipolar	HPLC
65 μm , fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	270 °C	Bipolar	GC
Poliacrilato (PA)			
85 μm , fase parcialmente entrecruzada	320 °C	Polar	GC/HPLC
Carboxen/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS)			
75 μm , fase parcialmente entrecruzada	320 °C	Bipolar	GC
85 μm , fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	320 °C	Bipolar	GC
Carbowax/Divinilbenceno (CW/DVB)			
65 μm , fase parcialmente entrecruzada	265 °C	Polar	GC
70 μm , fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	265 °C	Polar	GC
Carbowax/Templated Resin (CW/TPR)			
50 μm , fase parcialmente entrecruzada	-	Polar	HPLC
Divinilbenceno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS)			
50/30 μm , fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	270 °C	Bipolar	GC
50/30 μm , fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹) ²	270 °C	Bipolar	GC

¹ Fibras *Stableflex*: el recubrimiento está depositado sobre una fibra de sílice fundida flexible.

² Longitud especial de 2 cm.

Se debe tener en cuenta que las fibras son frágiles, se pueden romper con facilidad o dañarse con la inserción y agitación. La vida media de la misma es de aproximadamente de 100 extracciones, dependiendo de la matriz y del tipo de extracción empleada, ya sea por espacio confinado o por inyección directa, para esta última puede durar para un menor número de sorciones.

Considerando que las fibras están compuestas de diversas sustancias orgánicas, principalmente polímeros, es importante que antes de utilizarlas se acondicionen para retirar todo tipo de contaminantes.^[18]

2.2.5. Acondicionamiento de la fibra

Para el acondicionamiento de la fibra es necesario fijar la temperatura del puerto de inyección del cromatógrafo de gases según las indicaciones del fabricante al igual que ajustar el flujo del gas portador al caudal deseado; luego se introduce la misma al inyector el tiempo que determine el fabricante y a la temperatura señalada por éste, de forma tal de eliminar los residuos que puedan estar adheridos a ella. Si se utiliza un puerto de inyección Split/splitless, se puede abrir el respiradero del divisor y exponer la fibra por el tiempo recomendado por el fabricante. Ejemplo para una de PDMS de 30 μm se recomienda una temperatura de operación entre 200-280°C, a un tiempo de media hora.^[18]

2.2.6. Blanco de fibra

Después de acondicionar la misma se fija el puerto de inyección a la temperatura de operación deseada y se enfría el horno del cromatógrafo de gases a 50 °C o por debajo de esta temperatura; luego se fija la atenuación del detector en la sensibilidad deseada para el análisis y se cierra la válvula de Split del puerto de inyección y se inserta la fibra de MEFS, se comienza así con el programa de temperatura del cromatógrafo de gases para desorber la fibra por 5 minutos, una vez pasado el tiempo se retrae ésta y se observa el cromatograma. Se puede resaltar que este procedimiento se repite hasta que no aparece señal en el cromatograma.^[18]

2.2.7. Proceso de sorción y desorción en la MEFS

La fase estacionaria actúa como esponja, concentrando los analitos orgánicos de la matriz en su superficie durante la sorción, los cuales posteriormente serán desorbidos para su análisis. La muestra es colocada en un vial (ver figura n° 4), el cual se sella con un septum. Cuando la jeringa de MEFS perfora la septa y la fibra es expuesta en el vial, después de cierto tiempo se establece el equilibrio entre las distintas fases (matriz, fase gaseosa y fibra); una vez adsorbidos los analitos en la fibra, ésta se extrae y se inserta en el inyector del cromatógrafo, donde serán desorbidos los analitos.

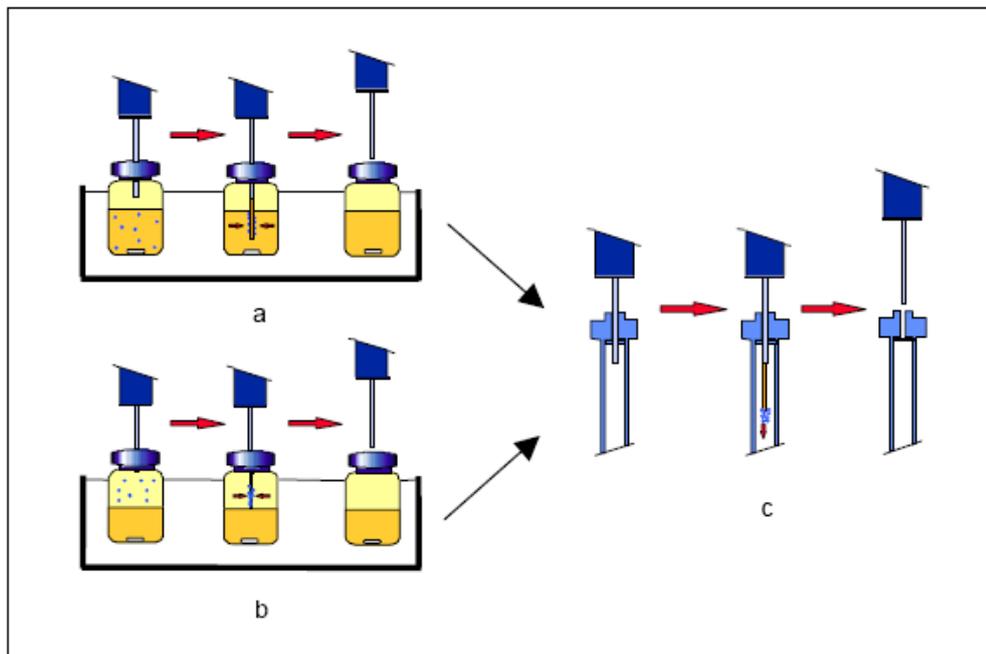


Figura N° 4. Proceso de sorción y desorción de la fibra para ID-MEFS y EC-MEFS.^[14]

La temperatura de desorción es aproximadamente igual al punto de ebullición del compuesto menos volátil y el tiempo de desorción depende de la temperatura del inyector y de la proporción de flujo del gas portador alrededor de la fibra.

En el espacio confinado la fibra no entra en contacto con la disolución, sólo se expone a la fase vapor o gaseosa de la muestra y en la inyección directa, la fibra se introduce directamente en la disolución.

La eficiencia de cada una de estas técnicas depende de las propiedades de los analitos y de la matriz de la muestra. En general ID-MEFS es más sensible que EC-MEFS, pero para los analitos más volátiles se utiliza EC-MEFS, ya que, de lo contrario los compuestos no volátiles se concentran en la fibra y reducen su vida media útil así como la reproducibilidad de la sorción.^[18]

2.2.8. Variables que afectan al proceso de MEFS.

El proceso de MEFS se puede ver afectado por una serie de variables experimentales que pueden ser modificadas para incrementar la eficacia del proceso de extracción. Entre estas variables se encuentra la **agitación de la muestra**, que incrementa la difusión de los analitos desde la matriz de la muestra a la fibra o al espacio confinado por lo que se disminuye el tiempo requerido para llegar al equilibrio. Otros parámetros importantes son el **tiempo y la temperatura de extracción**, así como la modificación de las condiciones de la muestra, y los parámetros que afectan la etapa de desorción. Estos últimos dependen de la técnica analítica que se utilice.^[19]

A continuación se comentará como influyen cada uno de estos parámetros en el proceso de MEFS.

2.2.8.1. Etapa de absorción/adsorción.

Los parámetros que pueden afectar de alguna u otra forma el proceso de absorción/adsorción son los siguientes: el tiempo y la temperatura de extracción, la agitación de la muestra, el volumen de muestra así como las condiciones de la muestra (pH, adición de sales o solventes orgánicos).^[19]

2.2.8.2. El tiempo de extracción en MEFS.

Es un parámetro muy importante a tener en cuenta. Al aplicar un método analítico basado en MEFS se debe determinar el tiempo necesario para llegar al estado de equilibrio que es característico de cada analito-fibra e intentar trabajar en esas condiciones. El tiempo de equilibrio es aquél a partir del cual la cantidad de analito extraída se mantiene constante (ver figura n° 5). Sin embargo, para algunos compuestos éste es muy elevado para llegar a esta situación, por lo que generalmente se opta por trabajar en condiciones de no equilibrio seleccionando tiempos de extracción inferiores para no alargar el análisis. En estos casos, es muy importante controlar estrictamente éste durante la extracción, ya que a pequeñas oscilaciones en la medida del mismo pueden variar de forma considerable la cantidad de analito extraída.



Figura N° 5 Variación con el tiempo de la cantidad de analito retenida por la fibra en MEFS.^[11 y 14]

2.2.8.3. Temperatura de extracción.

Este parámetro contribuye de dos formas completamente opuestas en el proceso de MEFS. Por un lado, los coeficientes de difusión de los analitos en la muestra aumentan al incrementar la temperatura, por lo que aumenta la cantidad de analito extraída. En EC-MEFS, además, al aumentar la temperatura aumenta la concentración de los analitos en el espacio confinado, por lo que la extracción es también más rápida. Por otro lado, un aumento de la temperatura disminuye los coeficientes de distribución del analito entre la muestra y la fibra por lo que la eficacia de la extracción se ve afectada negativamente. ^[19]

2.2.8.4. La concentración de sal en la muestra y la modificación del pH.

La presencia de sales, generalmente NaCl (aunque en algunos casos se han utilizado otras sales como Na₂SO₄), en la muestra aumenta el coeficiente de distribución de los analitos que están presentes en forma no ionizada por lo que la cantidad de analito extraída generalmente aumenta. Sin embargo, si los analitos están en forma ionizada, se observa una disminución de la eficacia de la extracción. Esto se debe al aumento del coeficiente de actividad de las especies iónicas al aumentar la fuerza iónica de la solución. Por lo que, el pH de la muestra es otro factor a tener en cuenta en la optimización del proceso de MEFS ya que los analitos deben estar siempre presentes en la muestra en su forma neutra para su extracción. Por ejemplo, para que los analitos estén presentes en la forma neutra, es recomendable trabajar a valores de pH al menos dos unidades por debajo del pKa si los analitos son ácidos. ^[19]

2.2.8.5. El volumen de muestra.

Es otro parámetro a tener en cuenta al desarrollar un método analítico basado en MEFS. Así, éste se debe seleccionar en función de los coeficientes de

distribución de los analitos, K_{fs} . Éstos pueden estimarse a partir de datos bibliográficos o bien calcularse a partir de una serie de ecuaciones matemáticas.^[18]

2.2.8.6. Agitación de la muestra.

Como los analitos de la muestra deben ser transportados de la matriz a la fibra, en caso de extracción directa, y de la matriz al espacio confinado y de allí a la fibra para el caso de EC-MEFS. Se utiliza la agitación magnética o por ultrasonido para facilitar la difusión de los analitos a la superficie de la fibra, disminuir el efecto de reducción de la velocidad de extracción causada por la zona estática que se forma alrededor de la fibra, y compensar los bajos coeficientes de difusión de las matrices líquidas.^[19]

2.2.9 Etapa de desorción

Los parámetros que afectan a la etapa de desorción dependen del tipo de desorción utilizado (térmica o por solvente orgánico). Si ésta se realiza térmicamente en un cromatógrafo de gases, los parámetros a optimizar son la temperatura y el tiempo de desorción. La temperatura se recomienda fijarla a la máxima temperatura de uso de la fibra recomendada por el fabricante y el tiempo debe ser el adecuado para que la desorción de los analitos de la fibra sea completa y no haya efecto memoria. Esto puede suceder si el tiempo o la temperatura de desorción no son suficientes para la desorción completa de los analitos.

Cuando la desorción se realiza mediante el uso de un solvente orgánico y fuera de línea con el cromatógrafo de líquidos, los parámetros a optimizar son el tipo de solvente orgánico (que debe ser compatible con la fibra y con la técnica analítica posterior) y el volumen de solvente. En general, debe utilizarse el menor volumen de solvente orgánico posible sin que se produzca efecto memoria de forma tal que el factor de preconcentración sea mayor.^[14,18 y 19]

2.3. Cromatografía de gases

La cromatografía es la ciencia y el arte de separar entre sí los componentes de una sustancia con la ayuda de una fase estacionaria una móvil. ^[18] Se ha señalado que quien la desarrolló fue el botánico ruso Mikhail Tswett a principios del siglo XX, cuando este empleó la técnica para separar varios pigmentos vegetales, tales como clorofilas y xantofilas, haciendo pasar disoluciones de estos compuestos a través de una columna de vidrio rellena con carbonato de calcio finamente dividido. Las especies separadas aparecían como bandas coloreadas en la columna, lo que justifica el nombre que eligió para el método (del griego chroma que significa «color», y graphein que significa «escribir»). ^[20]

El concepto de cromatografía gas-liquido fue enunciado por primera vez, en 1941, por Martin y Synge.

La cromatografía de gases es una técnica analítica de separación que ha experimentado un gran desarrollo desde sus inicios. Además, sus posibilidades han ido ampliándose a medida que se ha mejorado la instrumentación (columnas capilares, integradores computarizados, sistemas de gradiente de temperatura, nuevos detectores, etc). En este caso de las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que es un gas. Esta se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible y que se coloca en una columna. Las dos son elegidas de manera que los componentes de la muestra se distribuyen de modo diferente en ambas, produciéndose así la separación deseada. ^[21]

En la cromatografía de gases (CG), la muestra se volatiliza en el puerto de inyección pasando inmediatamente a la columna cromatográfica (inyección directa). La elución se produce por el flujo de un gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases (CG): La de gas-sólido (CGS) y la de gas-líquido (CGL),

siendo esta última la más ampliamente utilizada, y que se puede llamar simplemente cromatografía de gases.

La cromatografía gas-líquida se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida soportada sobre una superficie de un sólido inerte.^[21]

2.3.1. Ventajas de la cromatografía de gases:

- La rapidez de los análisis, ya que, las corridas cromatográficas duran unos pocos minutos.
- Eficiencia, debido a la alta resolución y gran longitud de la columna.
- Sensible, ya que se pueden realizar detecciones en el orden de los ppm ó ppb.
- Es una técnica no destructiva en algunos casos, haciendo posible un acoplamiento en línea, como por ejemplo con un espectrómetro de masas.
- Alta precisión en el análisis cuantitativo, con un RSD característico entre 1-5%
- No requiere de grandes cantidades de muestra, ya que, se utilizan volúmenes en el orden de los μL .
- Es una técnica relativamente sencilla.
- Comparada con otras técnicas de análisis, presenta bajo costo.

2.3.2. Desventajas de la cromatografía de gases:

- Se limita el análisis de muestras volátiles.
- No es recomendable para muestras térmicamente inestables.

- En algunos casos requiere de métodos espectroscópicos, usualmente un espectrómetro de masa, para confirmar la identidad de la muestra.^[22]

2.3.3. Cromatógrafo de Gases

Un Cromatógrafo de gases (ver figura n° 6), consta de diversos componentes como el gas portador, el sistema de inyección de muestra, la columna (generalmente dentro de un horno), y el detector.

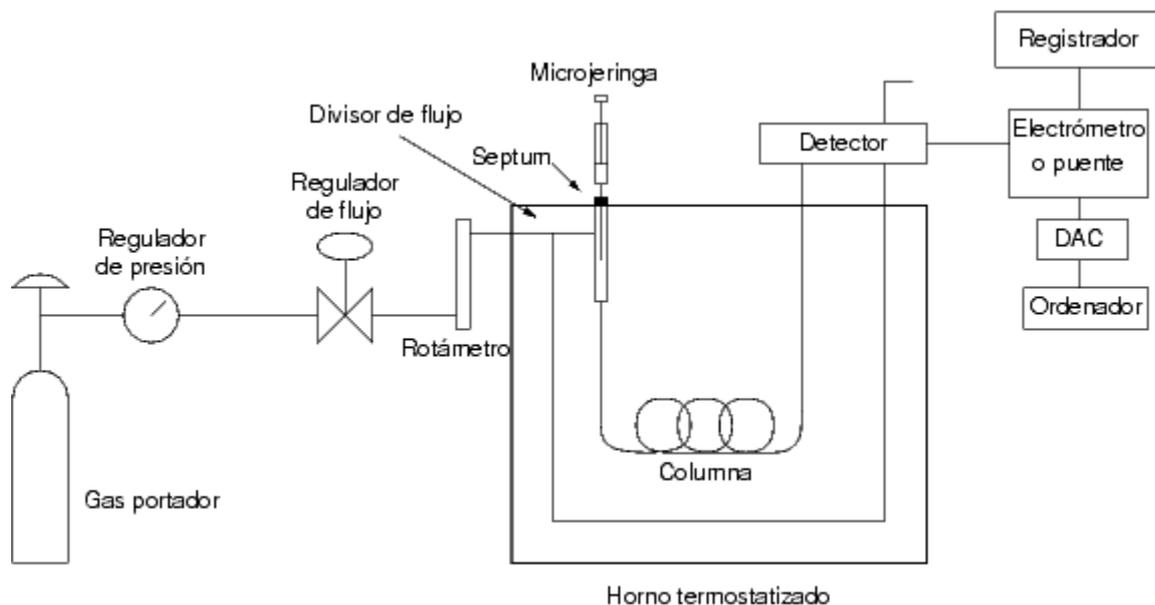


Figura N° 6. Diagrama de un cromatógrafo de gases^[22]

A continuación se realizará una breve descripción de cada uno de los componentes principales que integran el cromatógrafo de gases:

2.3.3.1. Sistema de suministro del gas

El gas portador cumple básicamente dos propósitos: Transportar los componentes de la muestra, y crear una matriz adecuada para el detector. [22]

El gas portador debe reunir ciertas condiciones:

- Debe ser inerte para evitar interacciones (tanto con la muestra como con la fase estacionaria).
- Debe ser capaz de minimizar la difusión gaseosa.
- Fácilmente disponible y puro.
- Económico.
- Adecuado al detector a utilizar.

Generalmente se emplean gases como el helio, argón, nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono, y la elección de este gas en ocasiones depende del tipo de detector empleado. El almacenaje del gas puede ser en bombonas normales o empleando un generador, especialmente en el caso del nitrógeno y del hidrógeno. Luego tenemos un sistema de manómetros y reguladores de flujo para garantizar un flujo estable y un sistema de deshidratación del gas, como puede ser un tamiz molecular. [22]

2.3.3.2. Sistema de inyección de muestra

La inyección de muestra es un apartado crítico, ya que se debe inyectar una cantidad adecuada, y debe introducirse de tal forma (como un "tapón de vapor") que sea rápida para evitar el ensanchamiento de las bandas de salida; este efecto se da con cantidades elevadas de analito. El método más utilizado emplea una microjeringa (de capacidades en microlitros) para introducir el analito en una cámara de vaporización instantánea. Esta cámara está a 50 °C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil, y está sellada por una junta de goma de silicona, septa o septum.

El mejor gas a usar en la columna cromatográfica como portador de los analitos es el hidrógeno, sin embargo dada su peligrosidad, es usado más para encender el detector FID, junto con el aire. ^[22]

2.3.3.3. Puerto de inyección

Una vez inyectada la muestra en el puerto de inyección (ver figura 7), la entrada de la misma puede ocurrir de diferentes formas (ver figura 8):

- **“Split” o división de flujo**, donde una vez volatilizada la muestra se despreja una fracción del volumen inyectado, por lo que frente a otros tipos de inyección requiere una concentración superior del extracto. Se recomienda cuando se utilizan columnas capilares, para no causar sobrecarga en la fase estacionaria. ^[22]
 - 0.1-1% de la muestra va a la columna.
 - Resto a desperdicios ^[23]
- **“Splitless” o flujo sin dividir**, donde una vez volatilizada, toda la muestra pasa a la columna. Es recomendada cuando se va a realizar análisis a niveles de trazas. ^[22]
 - Toda la muestra va a la columna
 - Ideal para análisis cuantitativo
 - Solo para análisis de trazas o muestras de baja concentración ^[23]
- **On-column o en columna**, donde la muestra no sufre un paso previo de volatilización, sino que se inyecta directamente en la columna en forma líquida. ^[22]
 - Para muestras que se descomponen por encima de su punto de ebullición
 - Puerto de inyección no calentado

- La columna debe encontrarse a una temperatura baja para condensar la muestra en una banda estrecha
- Al calentar la columna la cromatografía comienza. [23]

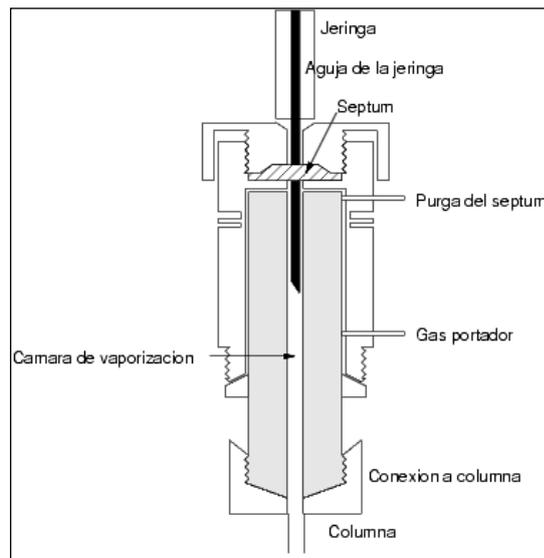


Figura N° 7. Inyector de muestra para un CG [22]

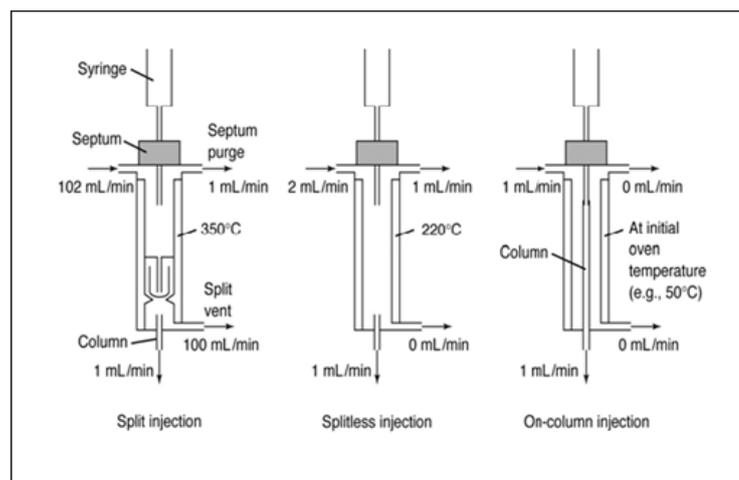


Figura N° 8. Sistema de Inyección para CG [23]

2.3.3.4. Columna y fase estacionaria

La columna es el lugar donde ocurre la separación de los componentes de la muestra a analizar. Se dice que es el corazón de un cromatógrafo.

En CG se emplean dos tipos de columnas: las empaquetadas o de relleno y las tubulares abiertas o capilares. Estas últimas son más comunes, debido a su mayor rapidez y eficiencia.

Los materiales con los cuales generalmente se pueden elaborar las columnas son: Sílice fundida, acero inoxidable, vidrio ó teflón. En ella se encuentra la fase estacionaria (líquida ó sólida), y presentan distintas medidas ó tamaño según el tipo de aplicación.^[22]

Las columnas de relleno o empaquetadas (ver figura nº 9), consisten en unos tubos de vidrio, teflón, metal (inerte a ser posible como el acero inoxidable, níquel, cobre o aluminio), de longitud de 2 a 3 metros y un diámetro interno de unos pocos milímetros, típicamente de 2 a 4. El interior se rellena con un material sólido, finamente dividido para tener una máxima superficie de interacción y recubierto con una capa de líquido de espesores entre 50 nm y 1 μm . Para que puedan introducirse en el horno, se enrollan convenientemente.

El material de relleno ideal consiste en pequeñas partículas, esféricas y uniformes, con una buena resistencia mecánica, para tener una máxima superficie donde interaccionar la fase estacionaria y el analito. La superficie específica mínima debe ser de 1 m^2/g .^[21]

Debe ser inerte a altas temperaturas y humectarse uniformemente con la fase líquida estacionaria.^[21]

El material preferido es la tierra de diatomeas natural, debido a su tamaño de poro natural. Estas especies, utilizaban un sistema de difusión molecular para tomar nutrientes del medio y expulsar sus residuos. Por tanto, debido a que el sistema de

adsorción superficial del analito y la fase estacionaria es parecido, son materiales especialmente útiles. ^[22]



Figura N° 9. Columna de relleno ^[22]

Las columnas capilares son de tres tipos básicos (ver figuras 10 y 11): Las de pared recubierta conocida por sus siglas en inglés como “wall-coated open tubular” (WCOT), son simplemente tubos capilares donde la pared interna se ha recubierto con una fina capa de fase estacionaria. Las de soporte recubierto o en inglés “support-coated open tubular” (SCOT) que tienen en su parte interna una fina capa de material inerte como el empleado en las columnas de relleno (tierra de diatomeas) donde se adherido la fase estacionaria. La ventaja de las SCOT frente a las WCOT, es la mayor capacidad de carga de esta última, que en su fabricación se emplean mayores cantidades de fase estacionaria, al ser la superficie de intercambio mayor. Otra columna capilar es en la que la fase móvil se une químicamente a sus paredes y se fabrica a partir de sílice fundida, conocidas como columnas tubulares abiertas de sílice fundida o FSOT (ver figura 12). Las columnas FSOT tienen diámetros internos variables, entre 250 y 320 μm (para columnas normales) y 150-200 μm para columnas de alta resolución. Estas últimas requieren menor cantidad de analito y un detector más sensible, al eluir menor cantidad de gas. ^[22]

Por orden de eficiencia, en primer lugar están las FSOT luego WCOT, SCOT y por último las de relleno.

Existen asimismo columnas macrocapilares con diámetros de hasta 530 μm , que admiten cantidades de analito comparables a las de relleno pero con mejores resultados. ^[20]



Figura N° 10. Columna capilar ^[23]

2.3.3.5. Factores que afectan la eficiencia de una columna

- Longitud de la columna.
- Diámetro de la columna (1/4", 1/8", 1/16" de diámetro externo).
- Tamaño de las partículas del relleno.
- Naturaleza de las fases.
- Cantidad de fase estacionaria.
- Temperatura de la columna.
- Velocidad del gas portador.
- Cantidad de muestra inyectada.
- Material del cual está elaborada la columna.
- Enrollado de la columna. ^[22]

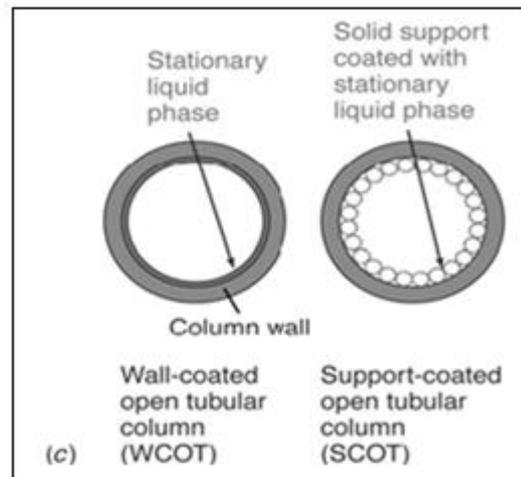


Figura N° 11. Columnas tubulares abiertas WCOT y SCOT ^[23]

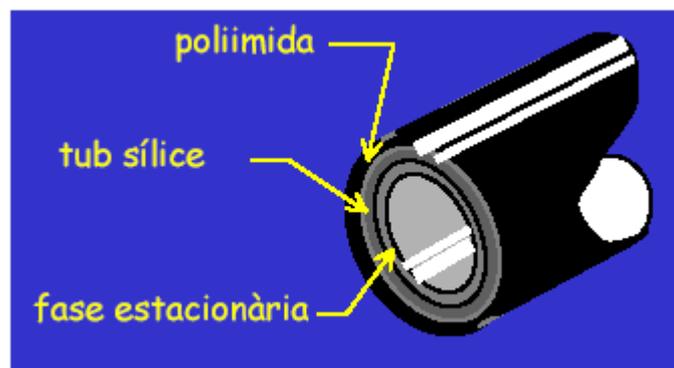


Figura N° 12. Columnas tubular abierta FSOT. ^[23]

2.3.3.6. La fase estacionaria

Las propiedades necesarias para una fase estacionaria líquida inmovilizada son:

1. Características de reparto (factor de capacidad κ' y factor de selectividad α) adecuados al analito.
2. Baja volatilidad, el punto de ebullición de la fase estacionaria debe ser al menos 100°C mayor que la máxima temperatura alcanzada en el horno.
3. Baja reactividad.
4. Estabilidad térmica, para evitar su descomposición durante la elución.

Existen como mucho una docena de disolventes con estas características (ver tabla n° 4). Para elegir uno, debe tenerse en cuenta la polaridad del analito, ya que a mayor polaridad del analito, mayor polaridad deberá tener la fase estacionaria.^[22]

Tabla N° 4. Fases estacionarias comunes y aplicaciones. ^[22]

FASE ESTACIONARIA	APLICACIONES COMUNES
Polidimetilsiloxano	Fase no polar de uso general para hidrocarburos, aromáticos, polinucleares, drogas, esteroides y PCBs.
Poli(fenilmetildifenil)siloxano (10% fenilo)	Para ésteres metílicos de ácidos grasos, alcaloides, drogas y compuestos halogenados.
Poli(fenilmetil)siloxano (50% fenilo)	Para drogas, esteroides, pesticidas y glicoles.
Poli(trifluoropropildimetil)siloxano	Para aromáticos clorados, nitroaromáticos, bencenos alquilsustituídos
Polietilenglicol	Para compuestos polares, también para compuestos como glicoles, alcoholes, éteres, aceites esenciales
Poli(dicianoalildimetil)siloxano	Para ácidos grasos poliinsaturados, ácidos libres y alcoholes.

2.3.3.7. Horno del cromatógrafo de gases

La temperatura de la columna es una variable importante que para un trabajo preciso ha de regularse a las décimas de grado, por ello la columna normalmente se introduce dentro de un horno de temperatura controlada. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación requerido.

El horno posee un sistema de calefacción eléctrico con un sistema de ventilación adecuado regido por un sistema electrónico. [22]

2.3.3.8. Sistema de detección

El detector es la parte del cromatógrafo que se encarga de determinar cuándo ha salido el analito por el final de la columna.

Las características de un detector ideal son:

- **Sensibilidad:** Es necesario que pueda determinar con precisión cuándo sale analito y cuando sale sólo el gas portador. Tienen sensibilidades entre 10^{-8} y 10^{-15} g/s de analito.
- **Respuesta lineal al analito** con un rango de varios órdenes de magnitud.
- **Tiempo de respuesta corto**, independiente del caudal de salida.
- **Intervalo de temperatura de trabajo amplio**, por ejemplo desde temperatura ambiente hasta unos 350-400°C, temperaturas típicas trabajo.
- **No debe destruir la muestra.**
- **Estabilidad y reproducibilidad**, es decir, a cantidades iguales de analito debe dar salidas de señal iguales.
- **Alta fiabilidad y manejo sencillo.**
- **Respuesta semejante para todos los analitos**, o
- **Respuesta selectiva y altamente predecible** para un reducido número de analitos. [22]

En Cromatografía de gases existen diversos detectores y su empleo depende de la muestra que se vaya analizar, entre ellos tenemos:

❖ **Detector de ionización de llama (FID, Flame Ionization Detector).**

Es uno de los detectores más usados y versátiles. Básicamente es un quemador de hidrógeno/oxígeno, donde se mezcla el efluente de la columna (gas portador y analito) con hidrógeno. Inmediatamente, este gas mezclado se enciende mediante una chispa eléctrica, produciéndose una llama de alta temperatura.

El proceso de ionización que se da en la llama es complejo, pero se puede aproximar el número de iones producidos al número de átomos de carbono transformados en la llama. Esto produce que sea un detector sensible a la masa (al número de átomos de carbono que salen de la columna) más que a la concentración, por lo tanto no le afectan demasiado los cambios en el flujo de salida.

Existen algunos grupos funcionales que no dan respuesta en este detector, como el carbonilo, alcohol, halógeno o amina, y tampoco responden gases no inflamables como el CO₂, SO₂, agua y óxidos de nitrógeno. Este hecho, más que limitar el ámbito de aplicación de este detector, permite el análisis de muestras contaminadas con alguno de los compuestos mencionados.

Ventajas:

- Alta sensibilidad, del orden de 10⁻¹³ g/s.
- Amplio intervalo lineal de respuesta, 10⁷ unidades.
- Bajo ruido de fondo (elevada relación señal/ruido).
- Bajo mantenimiento, fácil de fabricar.

Desventajas:

- Destruye la muestra (la piroliza).

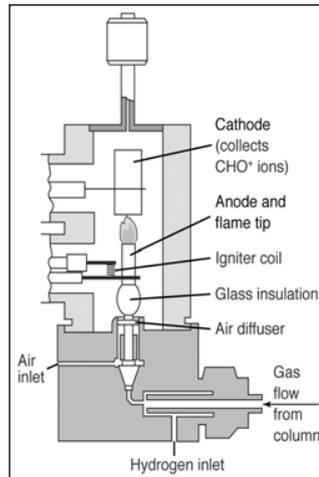


Figura N° 13. Detector de ionización de llama (FID, Flame Ionization Detector). [22]

❖ **Detector de conductividad térmica (TCD, Thermal Conductivity Detector).**

Tiene una amplia aplicación y su uso se basa en la diferencia de conductividad térmica del gas portador cuando circula también analito. Este tipo de detector se denomina también catarómetro. El sensor de un catarómetro consiste en un elemento calentado eléctricamente (resistencia). Esta resistencia, para una potencia eléctrica constante, tiene una temperatura que depende del gas circundante.

Ventajas de este detector:

- Simplicidad.
- Amplio rango dinámico lineal, 10^5 unidades.
- Respuesta universal a compuestos orgánicos e inorgánicos.
- Detector no destructivo.

Desventajas:

- Sensibilidad relativamente baja, 10^{-8} g de soluto/ml de gas portador.
- Imposibilidad de utilizarlo en columnas capilares (caudal de salida pequeño).

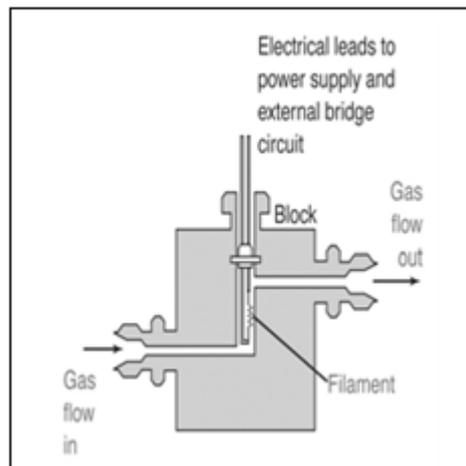


Figura N° 14. Detector de conductividad térmica (TCD, Thermal Conductivity Detector).^[22]

❖ **Detector termoiónico (TID, thermoionic detector).**

Es un detector usado en cromatografía de gases. Es selectivo para compuestos orgánicos fosforados y nitrogenados, aunque su respuesta no es igual para ambos elementos, siendo para el fósforo 10 veces mayor que para el nitrógeno. Es unas 500 veces más sensible que el detector de ionización de llama para compuestos fosforados y unas 50 veces más sensible para compuestos nitrogenados (típicamente aminas, nitratos y otras especies). Debido a esta sensibilidad obtenida con compuestos fosforados, su uso es amplio en la determinación de pesticidas fosforados.^[22]

❖ Espectrómetro de masas

El espectrómetro de masas es un instrumento que permite analizar con una gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga (m/z). Puede utilizarse para identificar los diferentes elementos químicos que forman un compuesto o determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto.

El espectrómetro de masas mide razones carga/masa de iones, calentando un haz de material del compuesto a analizar hasta vaporizarlo e ionizar los diferentes átomos. El haz de iones produce un patrón específico en el detector que permite analizar el compuesto químico.^[24]

❖ Otros detectores

La cromatografía de gases con detección selectiva de masas (más comúnmente conocida como cromatografía gases/espectrometría de masas), abreviada como GC-MS o GC/MS. GC/MS es una herramienta de análisis muy poderosa y es el método a elegir para el análisis de mezclas complejas orgánicas.

2.4. Trigo

Es el término que se designa al conjunto de cereales, tanto cultivados como silvestres, que pertenecen al género (*Triticum*); que significa “quebrado”, “triturado” o “trillado”, son plantas anuales de la familia de las gramíneas, ampliamente cultivadas en todo el mundo. La palabra trigo se designa tanto a la planta como a sus semillas comestibles, tal y como ocurre con los nombres de otros cereales.^[25]

El trigo (de color amarillo) es uno de los tres granos más ampliamente producidos globalmente, junto al maíz y el arroz, y el más ampliamente consumido por el hombre en la civilización occidental desde la antigüedad. El grano del trigo es

utilizado para hacer harina, harina integral, sémola, cerveza y una gran variedad de productos alimenticios. ^[25]

Clases de trigo están basadas en la dureza, color, y temporada de cultivo de las diferentes variedades de trigo. **Los trigos duros** (HRW) tienen un alto contenido de proteínas comparadas contra los trigos suaves y son utilizados principalmente para los productos leudados con levadura. **Los trigos suaves** (TSRW) son usados principalmente para productos leudados químicamente. Los trigos Durum son un tipo de trigo duro que se utiliza principalmente en la elaboración de pastas. ^[25]

En Venezuela existe un excesivo consumo de trigo que nos hace dependiente de importaciones, pues el que se produce en el país es sólo de carácter artesanal, cultivándose en pequeñas cantidades en algunas regiones como Mérida, Trujillo y Táchira. ^[26]

De acuerdo a estudios del Sistema de Vigilancia Alimentaria y Nutricional (SISVAN) referentes a la evolución de la disponibilidad para el consumo humano (DCH) 1990-2009, se evidencia que la harina de trigo es el cereal con mayor disponibilidad en el país. De hecho, para el 2009 las proyecciones de las importaciones para ese rubro están sobre las 8.000 toneladas métricas, seguido por la harina de maíz precocida y el arroz pulido. “Eso se traduce en que el venezolano depende de los productos derivados del trigo y nos hace vulnerables ante cualquier crisis. Actualmente el INN (Instituto Nacional de Nutrición), promueve el rescate del consumo de los cereales producidos en Venezuela como el maíz y el arroz. Este se encuentra trabajando en la elaboración de fórmulas de pastas hechas a base de estos cereales. ^[26]

2.5. Maíz.

El maíz (*Zea mais*), es hoy por hoy el cereal más importante y significativo después del trigo en los intercambios mundiales, aunque lamentablemente, en su

mayor proporción como alimento destinado al ganado o materia prima para la obtención del almidón. ^[27]

El almidón del grano de maíz sirve como materia prima para la industria alimentaria. A partir del él se obtienen múltiples productos de panadería, maicena, confitería, goma de mascar, cervecería, entre otros.

El gluten de la semilla de maíz tiene un gran valor como materia alimenticia. Está formado por una mezcla de sustancias nitrogenadas (proteínas) contenidas en el grano. Se usa en la preparación de alimentos ricos en proteínas para el ganado. Los principales son los concentrados de gluten, con el 23% de sustancias proteicas, y las tortas de gluten con el 41%. ^[27]

2.5.1 Maíz blanco (*Vicia faba*).

La norma venezolana COVENIN lo tipifica como todo aquel maíz de granos blancos o blanco-amarillentos, que presenta un valor menor o igual a 3% de otros colores. ^[27 y 28]

2.5.2 Maíz amarillo (*Raphanus sativus*).

La norma venezolana COVENIN indica que es el maíz de granos amarillos o amarillos con un trozo rojizo, y que tenga un valor menor o igual a 6% de maíces de otro color. ^[27 y 28]

Considerado el “grano de oro” de América, el maíz es uno de los cereales de mayor importancia en nuestro país. Además de sus infinitos usos en la agroindustria, la alimentación humana y animal, constituye un recurso fundamental para la nutrición de la población, por ello no es gratuita su inserción en el ícono de la alimentación en Venezuela. ^[29]

En la actualidad no existe ningún país en el continente americano que no siembre maíz. En las tierras bajas del trópico se producen varias cosechas al año; en otras regiones se da una, por lo general. ^[29]

La producción nacional de maíz blanco y amarillo ha mantenido un incremento sostenido desde el año 1999 hasta 2009 de 132%, al pasar de 983 mil 121 toneladas a 2 millones 281 mil 931. ^[30]

3. ANTECEDENTES

Recientemente se realizaron diversas investigaciones sobre el estudio de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), en muestras de alimentos los cuales sirvieron de referencia para la realización del presente trabajo. A continuación se presentan algunos de ellos:

- ✓ **Perello y col (2009)**, realizaron un estudio de la concentración de HAPs en varios tipos de alimentos, entre las muestras analizadas se encuentran papa y arroz, el análisis se realizó antes y después de la cocción de las mismas, empleando una cocina de gas. Para el estudio se extrajeron los HAPs de las muestras con una mezcla hexano/acetona, se purificaron por cromatografía de exclusión y se analizaron en un GC-MS. Los límites de detección reportados son 0,075-1,000 µg/Kg. Los autores observaron que el contenido de HAPs aumenta en estos alimentos durante la cocción, para el caso del arroz pasa de 2,19 a 5,22 µg/Kg del total de HAPs. Además apreciaron que se registró un notable aumento del fenantreno y del pireno.^[31]

- ✓ **Tfouni y col (2009)**, estudiaron la presencia de 4 HAPs (benzo (a) antraceno, benzo (b) fluoranteno, benzo (k) fluoranteno y benzo (a) pireno), en muestras de jugo de caña de azúcar recolectadas en dos ciudades brasileñas. El estudio de las muestras se realizó mediante una extracción de los HAPs con diferentes alícuotas de ciclohexano, posteriormente se purificaron mediante cromatografía de absorción en columna y se analizaron por HPLC con detección por fluorescencia. Los límites de detección reportados fueron: 0,009; 0,006; 0,004 y 0,005 µg/Kg, respectivamente. Se observó la presencia de HAPs en 50 % de las muestras recolectadas, se encontró que la mayor incidencia ocurre en la recolección de la cosecha ya que arrojó niveles de (0,008 a 0,290) µg/Kg, comparado con los niveles de (0,006 a 0,033) µg/Kg producido entre la cosecha, por lo que se atribuyó al proceso de quema del cultivo.^[32]

- ✓ **Rey-Salgueiro y col (2009)**, estudiaron la presencia de 11 HAPs, en muestras comerciales de leche y formulas infantiles a base de cereales. El estudio se realizó mediante extracción de las muestras con diferentes proporciones de la una mezcla acetonitrilo/acetato de etilo y con terbutilhidroquinona. El extracto obtenido se centrifugó por 5 min, el sobrenadante se evaporó a sequedad y finalmente se disolvió en una solución buffer de pH 5,5 de acetato de amonio/ácido acético. El análisis se realizó por cromatografía líquida con detección por fluorescencia y fueron comparadas con el sistema LC-MS/MS. Concluyen que el método seleccionado es lo suficientemente robusto para cuantificar los HAPs en las muestras mencionadas, por lo que los límites de detección y de cuantificación fueron evaluados sobre la base del ruido obtenido. Se analizaron 19 muestras de leche para bebés y 17 muestras de cereales infantiles. La mayor incidencia de los HAPs se encontró sólo en dos muestras, una de leche y una de cereales donde el Benzo (k) fluoranteno, se encontró en niveles de 0,10 y 0,30 µg/Kg respectivamente. ^[33]

- ✓ **Martí-Cid y col (2008)**, realizaron un estudio de la concentración de 16 HAPs, en muestras de alimentos ampliamente consumidos en Cataluña España. El análisis se realizó mediante una extracción en frío empleando una mezcla acetona/hexano como disolvente, luego se purificaron empleando cromatografía de permeación en gel y se analizaron en un cromatógrafo de gases acoplados a un detector de masas. Los límites de detección reportados fueron de 0,2 µg/Kg, excepto para el acenaftileno que presentó 2 µg/Kg. Estos autores analizan una gran variedad de alimentos entre los que se encuentran: lechuga, tomate, coliflor, papas, arroz y cereales, para este último reportan un valor total de HAPs de 20,44 µg/Kg, además indicaron que el mayor consumo de este último rubro alimenticio, se encuentra en adolescentes (masculinos) con una posible ingesta diaria de 6,005 µg/Kg de HAPs. ^[34]

De la misma forma se ha utilizado la técnica de microextracción en fase sólida (MEFS) como técnica de extracción de HAPs en muestras de alimentos, entre los trabajos encontrados se pueden mencionar:

- ✓ **Plaza-Bolaños y col (2010)**, realizaron una revisión de la metodologías de extracción, técnicas de separación y detección que se aplican actualmente en la determinación de HAPs en muestras de alimentos y bebidas como: Aceites comestibles, alimentos ahumados, leche, infusiones de té entre otros. Entre las técnicas evaluadas se encuentra la microextracción en fase sólida donde los autores indican que el proceso por inmersión directa de la fibra en las muestras se ve afectado por el efecto matriz lo que causa la disminución de la eficiencia de la misma y estos aconsejan enjuagar esta con n-hexano antes de la inyección y de la desorción, a fin de eliminar posibles residuos grasos que estén presentes en la superficie de la misma. Por otra parte el proceso de EC-MEFS, de las evaluaciones realizadas en muestras de infusiones de té, donde se emplearon fibras de PA (polar), PDMS (no polar) y PDMS-DVB (polaridad media), se consiguen obtener los mejores resultados con esta última detectándose HAPs de hasta 4 anillos. La ventaja que presenta esta técnica es que se reduce la etapa de pre-tratamiento y entre sus inconvenientes la falta de reproducibilidad y corta vida de las fibras. Por lo que la aplicación de la misma aun es reducida en los análisis de rutina pero debe ser considerado como nuevo enfoque el cual puede ser útil en un futuro cercano al considerar el consumo de solventes o de muestra.^[12]

- ✓ **Ischizaki, A y col (2010)**, realizaron la determinación de 15 HAPs en muestras de alimentos, empleando un método automatizado de MEFS por HPLC con detección por fluorescencia. Estas fueron compradas en un supermercado y almacenadas a temperatura ambiente. Para el estudio se tomaron 50 mg de la muestra de té en polvo, se colocó esta en un tubo pyrex de 10 mL, se le añadió 1,0 mL de metanol y posteriormente los HAPs son extraídos con ultrasonido por 15 min, posteriormente se centrifugan durante 5

min y se toman alícuotas de 50 y 100 µL las cuales son colocadas en viales de 2 mL para posteriormente ser desorbidos mediante un gradiente de elución. Se obtienen rangos de concentración de 0,05-2,0 ng/mL y límites de detección de 0,32-4,63 pg/mL. La mayor incidencia de los HAPs se presenta en las muestras de té azul y té verde chino, para estos reportan un valor total de HAPs de 628,8 y 321,3 ng/g respectivamente. ^[35]

- ✓ **Viñas y col (2007)**, realizaron el análisis de 11 HAPs, en muestras de infusiones de té, por el método de microextracción en fase sólida por HPLC con detección por fluorimetría. Estos autores evaluaron 4 diferentes tipos de fibras de MEFS (PDMS 100 µm, PDMS-DVB 60 µm, PA 85 µm y CW/TPR 50 µm). Para el análisis por HPLC, los HAPs se extrajeron de la fibra con una mezcla de acetonitrilo-agua con la ayuda de una interfase. Para el estudio se emplearon viales de 15 mL a los cuales se añadió 7 mL de muestra de la preparada de la siguiente manera a 6 mL de la infusión de té se le agrega 1 mL de una solución tampón 1 M de acetato/ácido acético de pH 4,5. La fibra fue expuesta al espacio confinado por 60 min a 90 °C bajo agitación magnética. Los HAPs fueron desorbidos mediante un programa de gradiente de elución y la fibra que arrojó los mejores resultados fue la de 60 µm PDMS-DVB. Los límites de detección se obtienen entre 4 y 145 ng/L dependiendo del compuesto. La mayor incidencia de los HAPs determinados ocurrió en las muestras de té verde y té rojo por ejemplo para el caso del naftaleno arrojó valores de $66,4 \pm 4,0$ ng/mL y $47,8 \pm 2,6$ ng/mL respectivamente. El método en cuestión fue comparado empleando HS-SPME-GC-MS por lo que se determinó que el mismo, es una buena alternativa para determinar los HAPs en dichas muestras. ^[36]

- ✓ **Aguinaga y col (2007)**, trabajaron en la determinación de 16 HAPS, en muestras de leche y productos relacionados de diferentes marcas comerciales, usando el método de microextracción en fase sólida por inmersión directa. Estos autores evaluaron diferentes tipos de fibras de MEFS

(PDMS 100 μm , PDMS-DVB 65 μm y Poliacrilato 85 μm). El análisis de los HAPs se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas, equipado con fuente de iones inertes. Las muestras se disolvieron en agua y se colocaron en un vial de 15 mL para la extracción de los HAPs con la fibra. La fibra se expuso directamente en el líquido por 60 min a 55 °C bajo agitación magnética. Los HAPs fueron desorbidos en el cromatógrafo de gases a 270 °C en el puerto de inyección en modo splitless, la separación fue realizada en una columna capilar HP-5 MS (5 % difenil - 95 % dimetil polisiloxano) y la fibra que generó los mejores resultados fue la de PDMS/DVB. Los límites de detección se reportaron en un rango de (0,003-1,5) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Entre las muestras analizadas se encuentran leche de soya, formulas infantiles y yogurt. Indican que el método propuesto se aplicó con éxito, confirmando la presencia de fluoranteno y pireno en dos muestras de leche completa.^[37]

Por lo observado en los antecedentes el método de MEFS resulta muy atractivo, pues la extracción se realiza de manera rápida, además reduce la etapa de pre-tratamiento de las muestras y posee una gran cantidad de aplicaciones en el campo. Para las muestras sólidas no son muy numerosas las publicaciones encontradas, en vista de esto se decidió estudiar dicho método para la extracción de los HAPs que puedan estar presentes en muestras de cereales como: trigo y maíz, ya que estos son de gran consumo en nuestro país y las referencias consultadas no muestran algún estudio sobre las mismas, en vista de esto se propusieron los siguientes objetivos que se muestran a continuación:

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

- Estudiar la microextracción en fase sólida de los HAPs en muestras de cereales y su análisis por cromatografía de gases.

4.2. Objetivos específicos.

- Evaluar las condiciones óptimas de sorción y desorción de los HAPs con fibras de microextracción por el método de espacio confinado.
- Evaluar diferentes solventes para la extracción de los HAPs por ID-MEFS.
- Evaluar las condiciones óptimas de sorción y desorción de los HAPs con fibras de microextracción por el método de inmersión directa.
- Evaluar las figuras de mérito: Sensibilidad y reproducibilidad, para seleccionar el método de microextracción en fase sólida más adecuado.
- Evaluar el contenido de HAPs en diferentes cereales utilizando el método seleccionado.

5.PARTE EXPERIMENTAL

5.1 INSTRUMENTACIÓN

5.1.1 Cromatógrafo de gases

Para la determinación de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos se empleará un equipo de cromatografía de gases con detector de ionización a la llama (GC-FID), cuyas características se presentan en la tabla (n° 5) y se ilustra en las figuras 15.



Figura N° 15. Equipo de cromatografía de gases y equipo computarizado con el sistema de adquisición de datos.

Tabla N° 5. Características del equipo cromatográfico que se empleó.

Equipo	Cromatógrafo de gases
Marca	THERMO QUEST
Modelo	TRACE GC 2000
Columna	Capilar HP-5MS (Crosslinked 5% PDMS) con las siguientes dimensiones: (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
Gas de arrastre	Nitrógeno
Inyector	Modo Splitless
Detector	Ionización de la llama (FID)
Gases	Hidrógeno : 35 mL/min Aire: 350 mL/min Make-up Nitrógeno: 20 mL/min
Sistema de adquisición de datos	CHROM-CARD El algoritmo del software se basa en el balance de masa de vapor de disolvente, la ecuación es obtenida a partir de una evaluación de la cantidad de vapor generado en la unidad de tiempo durante el proceso de desolvatación de la muestra y que se retira en el mismo período de tiempo.

5.1.2 Preparación de la muestra.

Para la preparación tanto de las muestras sintéticas así como de las muestras de cereales se utilizaron:

1. Una balanza analítica.
2. Un mortero de vidrio marca Cole-Parmer (vernon Hills, Illinois, USA)

5.1.3. Sistema de sorción.

Para lograr la optimización de la etapa de sorción de los HAPs, se empleó:

1. Una Plancha de calentamiento (Dataplate modelo 730 series).
2. Agitación por ultrasonido (Cole-parmer 8890).
3. Diferentes tipos de fibras para microextracción en fase sólida, con diferentes recubrimientos y espesores entre los cuales mencionamos: 7 y 30 μm PDMS y de 65 μm PDMS-DVB, con su respectivo contenedor para la fibra: Holder MEFS para análisis por CG (SUPELCO).



Figura N° 16. Fibras de 7 y 30 μm PDMS y fibra de 65 μm PDMS-DVB, con su respectivo contenedor para la fibra: Holder MEFS para análisis por CG (SUPELCO).

4. Viales ámbar de 10 mL, con septum de silicona-teflón, utilizados en MEFS de la casa (SUPELCO).
5. Viales de 5 mL.

5.2. Reactivos

- ✓ Acetonitrilo, 99,9% grado HPLC Fisher Scientific.
- ✓ Acetato de etilo 98%, Perkin Elmer.
- ✓ Agua desionizada 17,4MΩ, obtenida del sistema de desionización Barnstead Nanopure.
- ✓ Ácido nítrico 65 % MERCK.
- ✓ Glicerina. Laboratorios FSICA.
- ✓ Patrones sólidos de HAPs: Naftaleno, Fluoreno, Antraceno y Criseno de Aldrich Chemical Company; Pireno de sigma y Benzo(a)pireno de Chem service.
- ✓ Silica Precipitated (SiO₂) de BDH laboratory reagents.
- ✓ Material estándar de referencia (CUS-9735, Ultra Scientific) suministrado por el Instituto Oceanográfico de la UDO.

5.3. Tipos de muestra

Se evaluaron muestras de cereales tales como: Trigo (TSRW) y (HRW) y muestras de maíz amarillo y blanco, proporcionadas por la compañía MONACA de Puerto Cabello, Estado Carabobo.

Cabe destacar que las muestras de trigo proporcionadas fueron tamizadas es decir estas se hicieron pasar por un tamiz el cual permite separar una mezcla que posee partículas de diferentes tamaños.^[38]

En cambio las muestras de maíz proporcionadas fueron liofilizadas previamente, es decir este proceso consiste en congelar el producto y una vez realizado esto, se introduce en una cámara de vacío para separar el agua por sublimación.^[39]

5.4. Procedimiento para la sorción de los analitos.

5.4.1 Tratamiento de la muestra.

Se evaluaron solventes como: Acetonitrilo y acetato de etilo, para extraer lo HAPs de los cereales de interés.

5.4.2 Sorción de los analitos.

Se realizó la evaluación de los métodos de microextracción en fase sólida (MEFS), EC-MEFS e ID-MEFS.

5.4.2.1 Procedimiento experimental EC-MEFS-CG.

- Tomar 1,0000 g de muestra y agregarlo a un vial de 10 mL y posteriormente sellar el mismo.
- Colocar vial en baño de glicerina a 93 °C e introducir la fibra al espacio confinado del vial por 60 min.

- Retraer la fibra e introducir ésta al puerto de inyección del cromatógrafo de gases para la posterior desorción de los compuestos.

5.4.2.2 Procedimiento experimental ID-MEFS-CG.

- Tomar 0,3000 g de muestra y colocar estos en un tubo de ensayo.
- Extracción de los HAPs con (8 mL)* de acetonitrilo*
- Agitar la mezcla por 20 min en ultrasonido.
- Centrifugar muestra a 1300 rpm por 4 min
- Tomar (5 mL)* de la mezcla y colocarla en vial de 5 mL de MEFS
- Se agita la solución por 1 min a (55 °C)* mediante agitación magnética.
- Introducir la fibra por inmersión directa a la solución por 60 min para la sorción de los HAPs.
- Retraer la fibra e introducir ésta al puerto de inyección del cromatógrafo de gases para la posterior desorción de los compuestos.

Las variables marcadas (*), fueron optimizadas durante el desarrollo del trabajo.

5.4.3 Desorción de los analitos.

Se procederá a la desorción en el puerto de inyección a 260 °C durante 10 min en modo splitless.

5.5. Figuras de merito.

En la evaluación de los métodos de MEFS por inmersión directa y por espacio confinado se estudiarán figuras de merito como sensibilidad y reproducibilidad para seleccionar el más adecuado para nuestro estudio.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Este capítulo del presente trabajo fue dividido en seis (6) secciones, entre las cuales se encuentran: **6.1. Selección de las condiciones del CG**, **6.2. Estudio por EC-MEFS-CG**, **6.3. Estudio por ID-MEFS-CG**, **6.4. Comparación entre EC-MEFS-CG e ID-MEFS-CG**, **6.5. Análisis de muestras** y **6.6. Repetitividad del Método empleado**.

6.1. Selección de las condiciones del CG

En esta sección se describen las condiciones empleadas para el estudio de los HAPs, donde se partió de las obtenidas por Mendoza, K. ^[18], y luego de varias experiencias se realizaron ciertas modificaciones, ya que, el objetivo del trabajo es estudiar la mayor cantidad de HAPs posibles, a continuación se aprecia la tabla n° 6 que muestra las modificaciones realizadas en las condiciones del cromatógrafo de gases, asimismo se puede observar los cambios realizados en la programación de temperatura en la tabla n° 7.

Tabla N° 6. Condiciones iniciales y finales empleadas en el cromatógrafo de gases.

	Inicial	Final
Temperatura del puerto de inyección (°C)	210	260
Temperatura del detector (°C)	250	300
Fase móvil	Nitrógeno	Nitrógeno

Tabla N° 7. Programación de temperaturas inicial y final empleadas ^[18].

Programación de temperatura inicial				
	Temperatura (°C)	Velocidad de calentamiento (°C/min)	Tiempo (min)	Tiempo de corrida (min)
Inicial	45	0	1	1
Rampa 1	190	25	0	7,6
Rampa 2	220	5	1	6,8
Tiempo total de corrida (min)				13,80
Programación de temperatura final				
	Temperatura (°C)	Velocidad de calentamiento (°C/min)	Tiempo (min)	Tiempo de corrida (min)
Inicial	45	0	1	1
Rampa 1	190	30	0	6,34
Rampa 2	220	5	10	20,49
Tiempo total de corrida (min)				27,83

6.2 Estudio por EC-MEFS-CG

6.2.1 Optimización de las masas de naftaleno, fluoreno y antraceno empleadas para la elaboración de las mezclas (I) y (II).

El siguiente paso a optimizar fue la cantidad en masa de los patrones sólidos puros de tres (3) HAPs conocidos (naftaleno, fluoreno y antraceno), esto con la intención de obtener las muestras que proporcionaran la mejor resolución de picos en el cromatograma sin saturar la señal; para ello se realizaron mezclas homogeneizadas de los HAPs a diferentes porcentajes y variando la masa de cada uno de ellos hasta obtener la mejor condición. Para el estudio se utilizó entre (0,01000 - 0,0200) g de las mezclas homogeneizadas y entre (0,9800 – 0,9900) g de sílica.^[18] El proceso de homogeneización consistió luego de pesar por separado cada patrón puro, en mezclar estos dentro de un mortero por un lapso de 5 min obteniéndose así la mezcla (I) que posee como características las mostradas en la

tabla n° 8, de ésta se tomó la cantidad establecida y se repitió el proceso de mezclado con la silica, para obtener de esta forma la muestra sintética (A). Las concentraciones correspondientes a los patrones que constituyen la muestra (A), se pueden apreciar en la tabla n° 9. Para extraer los analitos en estudio de esta muestra, las condiciones de sorción para espacio confinado empleadas fueron de, 60 min de exposición de la fibra y 93°C de temperatura del baño de glicerina y los resultados de las áreas obtenidas son presentados en la tabla (n° 10) con su correspondiente tiempo de retención.

Tabla N° 8. Proporciones de los patrones puros empleados para elaborar la mezcla (I)

Patrón	(Masa \pm 0,0001) g	% P/P \pm 0,03	(Concentración \pm S) ($\mu\text{g/g}$) $\cdot 10^{-3}$
Naftaleno	0,0156	0,98	10 \pm 1
Fluoreno	0,0761	4,78	48 \pm 5
Antraceno	1,5018	94,24	942 \pm 94

Tabla N° 9 Concentración de los HAPs contenidos en la muestra sintética A (producto de homogeneizar 0,0200 g de la mezcla (I) con 0,9800 g de silica).

Patrón	(Concentración \pm S) ($\mu\text{g/g}$) $\cdot 10^{-3}$
Naftaleno	0,20 \pm 0,02
Fluoreno	1,0 \pm 0,1
Antraceno	19 \pm 2

Tabla N° 10. Resultados Obtenidos para la muestra sintética (A), empleando la fibra de 30 μm de PDMS.

Patrón	t_R (min)	Área
Naftaleno	3,76	1.052.631
Fluoreno	5,86	3.106.518
Antraceno	6,78	7.601.591

A continuación se muestra el cromatógrama obtenido para 0,0200 g de la mezcla (I) homogeneizados con 0,9800 g de silica, empleando la fibra de 30 μm de PDMS (ver figura 17).

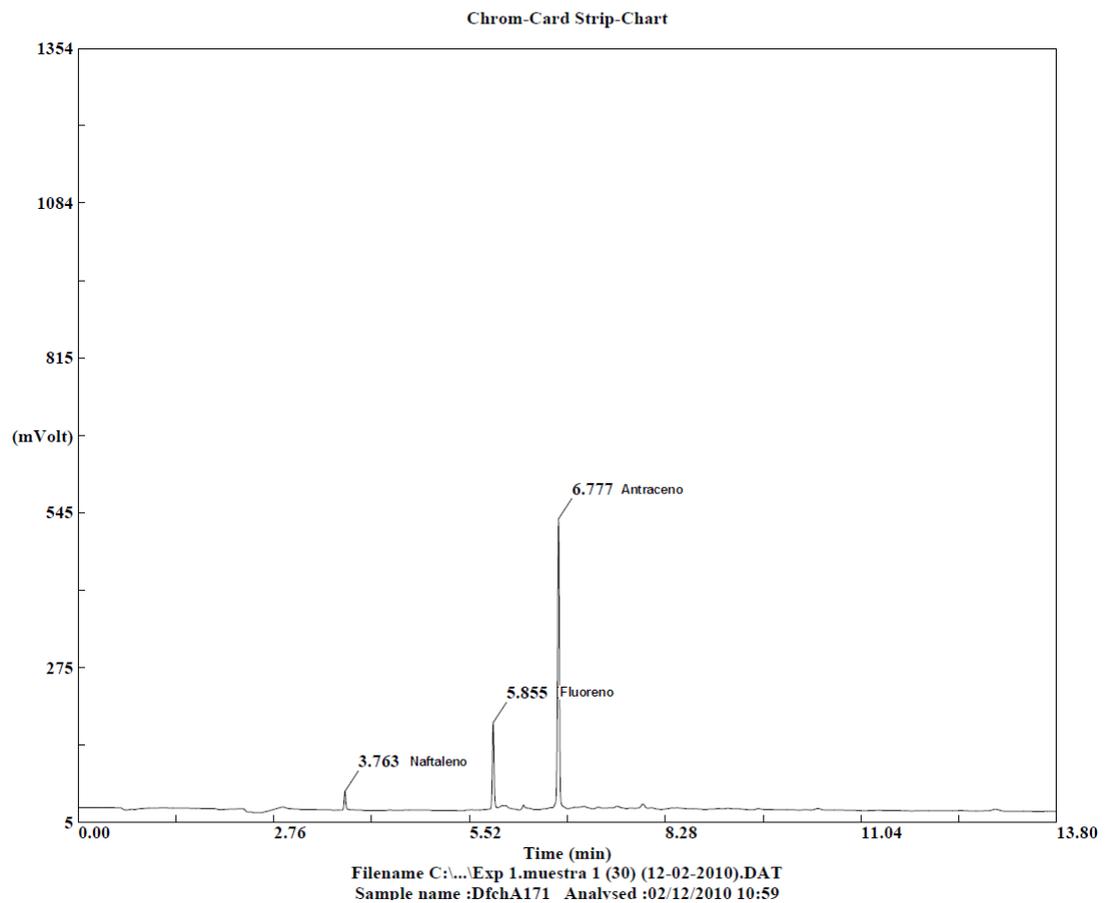


Figura N° 17. Muestra sintética (A), obtenida por EC-MEFS-CG, con la fibra de 30 μm de PDMS.

Se puede observar la aparición de los tres (3) picos que corresponden a los patrones de HAPs empleados. Con la intención de estudiar la sorción de una fibra de PDMS-DVB, también reportada en la literatura por (Aguinaga. N y col) ^[31], se procedió a evaluar el comportamiento, en las mismas condiciones, de la fibra de 65 μm de PDMS-DVB respecto a estos hidrocarburos en estudio. Se pudo notar, con la fibra compuesta, una señal saturada tanto para el antraceno como para el fluoreno (ver figura A.1-1 en el apéndice 1), por lo que fue necesario optimizar la cantidad en masa a emplear de cada compuesto y así formar la mezcla (II), la cual posee como proporciones las mostradas en la tabla n° 11.

Tabla N° 11. Proporciones de los patrones puros empleados para elaborar la mezcla (II)

Patrón	(Masa \pm 0,0001) g	% P/P \pm 0,01	(Concentración \pm S) ($\mu\text{g/g}$) $\cdot 10^{-3}$
Naftaleno	0,0304	3,77	10 \pm 4
Fluoreno	0,0253	3,14	48 \pm 3
Antraceno	0,7502	93,09	942 \pm 93

Se aprecia que se emplea una cantidad menor en masa de fluoreno y de antraceno no así de naftaleno, esto se realizó con la finalidad de observar una señal no saturada de los mismos.

Para el estudio en cuestión se elaboró la muestra sintética B, constituida por la homogeneización de 0,0100 g de la mezcla (II) con 0,9900 g de silica. La concentración a la cual se encuentran los patrones en dicha muestra, se pueden apreciar en la tabla n° 12.

Tabla N° 12 Concentración de los HAPs contenidos en la muestra sintética B (producto de homogeneizar 0,0100 g de la mezcla de patrones puros con 0,9900 g de silica).

Patrón	(Concentración \pm S) ($\mu\text{g/g}$) $\cdot 10^{-3}$
Naftaleno	0,38 \pm 0,04
Fluoreno	0,31 \pm 0,03
Antraceno	9,3 \pm 0,9

Los resultados correspondientes a las áreas obtenidas para cada compuesto se pueden observar en la tabla n° 13, con su respectivo tiempo de retención.

Tabla N° 13 Resultados Obtenidos para la muestra sintética (B), empleando la fibra de 65 μm de PDMS-DVB.

HAPs	t_R (min)	Área
Naftaleno	3,79	5.033.161
Fluoreno	5,89	8.707.436
Antraceno	6,91	58.252.160

Seguidamente se muestra el cromatograma obtenido (ver figura 18), para 0,0100 g de la mezcla (II) homogeneizados con 0,9900 g de silica, empleando la fibra de 65 μm de PDMS-DVB, así como la condición de 60 min de exposición de la fibra y el baño de glicerina a una temperatura de 93 °C.

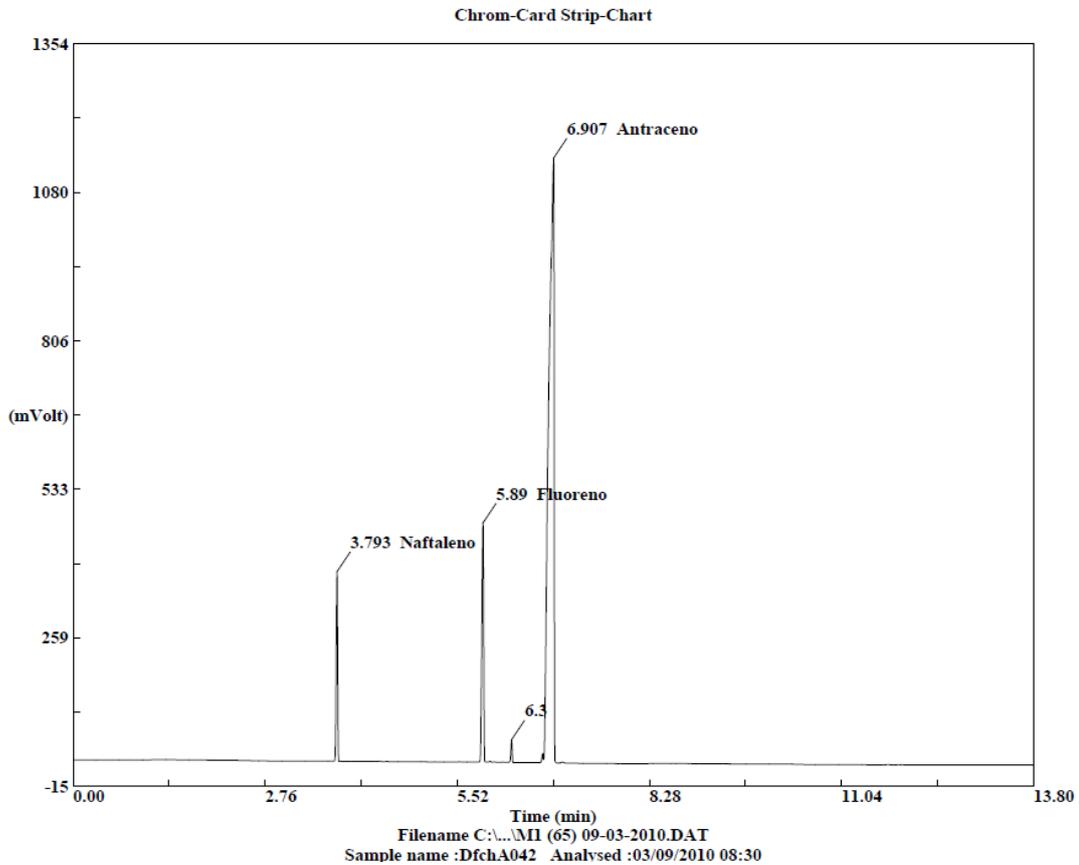


Figura N° 18. Muestra sintética (B), obtenida por EC-MEFS-CG, con la fibra de 65µm de PDMS-DVB.

Se puede apreciar que luego de optimizar la masa, se logra obtener una mejor señal de los patrones sólidos empleando la fibra de 65 µm de PDMS-DVB, por lo que ésta presenta una mayor sensibilidad respecto a la de 30 µm de PDMS y este hecho en sí será corroborado en (la página 65 cuando se presente la normalización de áreas realizada para las muestras sintéticas A y B). Por otra parte, observamos la presencia de un pico ($t_R = 6,3$ min), que fue recurrente su aparición y es el ubicado entre los picos de fluoreno y antraceno, para aclarar la duda respecto a éste, se aspiró 10 µL de aire presente en el ambiente con una jeringa y se inyectó directamente al cromatógrafo de gases, esto con la intención de verificar si el pico desconocido corresponde a algún compuesto que estuviese presente en el ambiente

de trabajo y sea éste el que contamine la fibra, el resultado obtenido para esta prueba puede apreciarse en la figura 19.

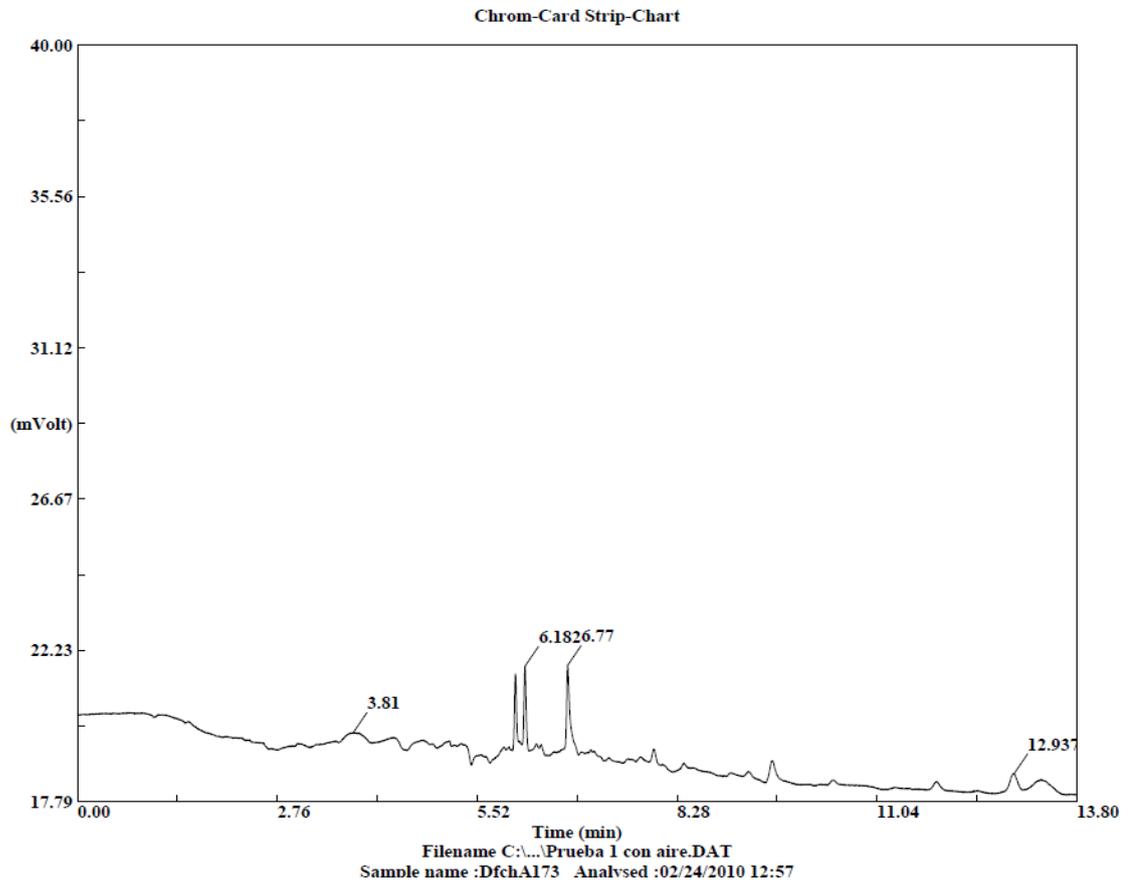


Figura N° 19. Inyección directa al cromatógrafo de gases de 10 μL de aire tomado del ambiente con la jeringa.

Obtenemos que la fibra de 65 μm de PDMS-DVB, logra adsorber algún compuesto y aparece reflejado en el pico que posee un ($t_R = 6,182$ min), que es el tiempo aproximado al pico ubicado entre el fluoreno y el antraceno. Esto debe ocurrir en el momento en que se retira la fibra del vial de MEFS y es trasladada al puerto de inyección del cromatógrafo de gases, donde ésta a pesar de estar retraída y protegida dentro de la jeringa de MEFS, es capaz de sorber estos contaminantes y por lo cual se demuestra que dicho pico no corresponde a los patrones sólidos empleados sino al compuesto sorbido del ambiente.

Retomando lo concerniente a la mayor sensibilidad mostrada por la fibra de 65 μm de PDMS-DVB, contra los resultados obtenidos por la de 30 μm de PDMS, se realizó la normalización de las áreas respecto a la concentración de cada patrón de HAPs empleando las muestras sintéticas A y B y se graficó el área normalizada versus cada hidrocarburo en cuestión; (la normalización consistió en dividir el área de cada compuesto entre su respectiva concentración) y a continuación se muestran los resultados obtenidos ver tabla n° 14.

Tabla N° 14. Resultados obtenidos para la normalización de áreas empleando las muestras sintéticas A y B.

	Muestra (A)	Muestra (B)
	(área/concentración) $\cdot 10^{-3}$	
Naftaleno	5,3	12,6
Fluoreno	3,1	29,0
Antraceno	0,4	6,3

A continuación se muestra la figura (20) obtenida de graficar la normalización de áreas versus los patrones individuales de HAPs.

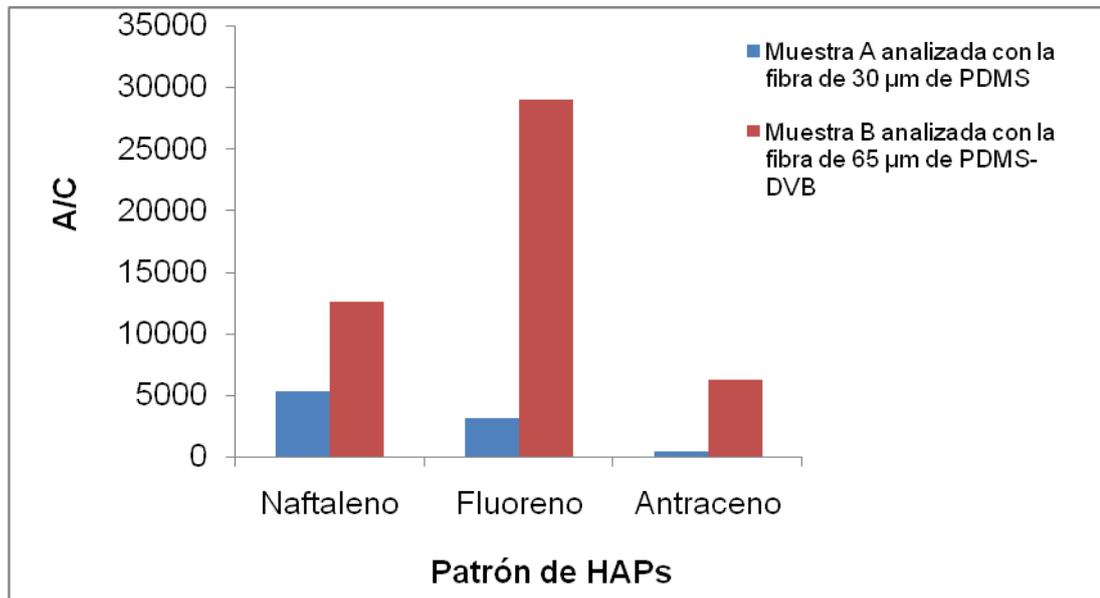


Figura N° 20. Normalización de áreas vs patrón de HAPs (muestras A y B).

Se demuestra por tanto que la fibra de 65 µm de PDMS-DVB, presenta mayor sensibilidad ya que se obtiene una relación de área/concentración superior empleando esta fibra que con la fibra de 30 µm de PDMS.

Esto planteado anteriormente es sustentado además por los resultados obtenidos por autores que son referencia en el presente trabajo y de los cuales cito: Aguinaga. N^[31], indica que la mayor sensibilidad que presenta dicha fibra es debido a las interacciones π - π entre el divinilbenceno (DVB) y los anillos de los hidrocarburos, por otra parte Peñalver. A^[14], atribuye esto a que al disminuir el espesor de la fibra, ésta limita su aplicación a un número más reducido de compuestos, es decir el polímero al ser más denso ocurre el proceso de adsorción, los analitos quedan en la parte superficial de la fibra por lo que requieren un mayor tiempo para alcanzar el equilibrio de sorción atribuyéndole esto mayor sensibilidad a la misma.

Por consiguiente se establece el siguiente orden de sensibilidad:

Fibra 65 µm de PDMS-DVB > Fibra 30 µm de PDMS

6.2.2 Selección de las condiciones óptimas de sorción y desorción de los HAPs por EC-MEFS-CG con la fibra de 65 µm de PDMS-DVB.

Para el inicio de los experimentos se debe indicar que se realizó la limpieza o blanco de la fibra (tal como se mencionó en el apartado 2.2.6, pagina 17), esto fue realizado entre cada experiencia, en donde la misma se expone en el puerto de inyección alrededor de 2 ó 3 veces a la programación de temperatura dada, hasta no observar señal en el cromatograma. En el apéndice 1 puede ser observada la figura (A.1-2) correspondiente a este procedimiento donde se comprueba que no existen impurezas presentes en la fibra, ya que, no se observa la aparición de pico alguno.

6.2.2.1 Etapa de sorción.

Para el proceso de la sorción de los HAPs presentes, se trabajó con las condiciones obtenidas por Mendoza, K. ^[18], debido a que logró optimizar las condiciones de sorción, evaluando estos hidrocarburos mediante el empleo de EC-MEFS-CG. El procedimiento desarrollado consistió en colocar el vial que contiene los HAPs en estudio, en un baño de glicerina a 93 °C y posteriormente exponer la fibra en el espacio confinado del vial, durante 60 min. Estas condiciones son las que se han venido empleando en los experimentos previos y las cuales no han ameritado modificación alguna ya que los HAPs estudiados hasta el momento se han podido observar correctamente.

6.2.2.2 Etapa de desorción.

De igual forma para la etapa de desorción se trabajó con la programación de temperatura (ver tabla n° 6, página 56), empleada por Mendoza, K. ^[18]. La única variación realizada fue en el tiempo de exposición de la fibra en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, se empleó 10 min en lugar de 5 min, y esto es realizado con la intención de garantizar la completa desorción de los HAPs en estudio.

Seguidamente se procedió a evaluar las condiciones obtenidas, en el multipatrón de referencia y así evaluar la cantidad de HAPs que son posibles detectar a las mismas.

6.2.3 Estándar de referencia.

En el siguiente estudio se evaluó el estándar de referencia (CUS-9735, Ultra Scientific) que contiene 25 HAPs de ellos los 16 seleccionados por la Agencia Federal para la Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos. Estos se evaluaron para identificar los tiempos de retención de cada uno, ya que la tabla (n° 15), sólo nos muestra la concentración de los mismos y esta es la información suministrada por el fabricante del patrón. Éste se encuentra disuelto en una mezcla acetonitrilo-diclorometano y el pico de solvente eluye en los cromatogramas que veremos posteriormente.

Tabla N° 15. Hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en el multipatrón de referencia (CUS-9735, Ultra Scientific)

Componente	Concentración (µg/mL)
Acenafteno	2006 ± 10
Acenaftileno	2008 ± 10
Antraceno	2008 ± 10
Benzo(a)antraceno	2006 ± 10
Benzo(a)pireno	2008 ± 10
Benzo(b)fluoranteno	2006 ± 10
Benzo(e)pireno	2004 ± 10
Benzo(ghi)perileno	2006 ± 10
Benzo(k)fluoranteno	2008 ± 10
Bifenilo	2002 ± 10
Criseno	2008 ± 10
Dibenzo(ah)antraceno	2008 ± 10
Dibenzotiofeno	2000 ± 10
Fluoranteno	2008 ± 10
Fluoreno	2008 ± 10
Indeno(123-cd)pireno	2006 ± 10
Naftaleno	2008 ± 10
1-metil-naftaleno	2006 ± 10
2-metil-naftaleno	2010 ± 10
2,6-dimetil naftaleno	2006 ± 10
2,3,5-triimetil naftaleno	2004 ± 10
Perileno	2000 ± 10
Fenantreno	2008 ± 10
1-metil fenantreno	2008 ± 10
Pireno	2008 ± 10

6.2.3.1 Identificación de los HAPs presentes en el estándar de referencia:

Para verificar la cantidad de HAPs presentes en este multipatrón y que puedan ser detectados a estas condiciones, se realizó la inyección directa al cromatógrafo de gases de 10 μ L del patrón (concentrado) de 400 ppm empleando la programación de temperatura presenta en la página 58 (tabla nº 7), realizado esto se obtuvo el siguiente cromatógrama (ver figura 21).

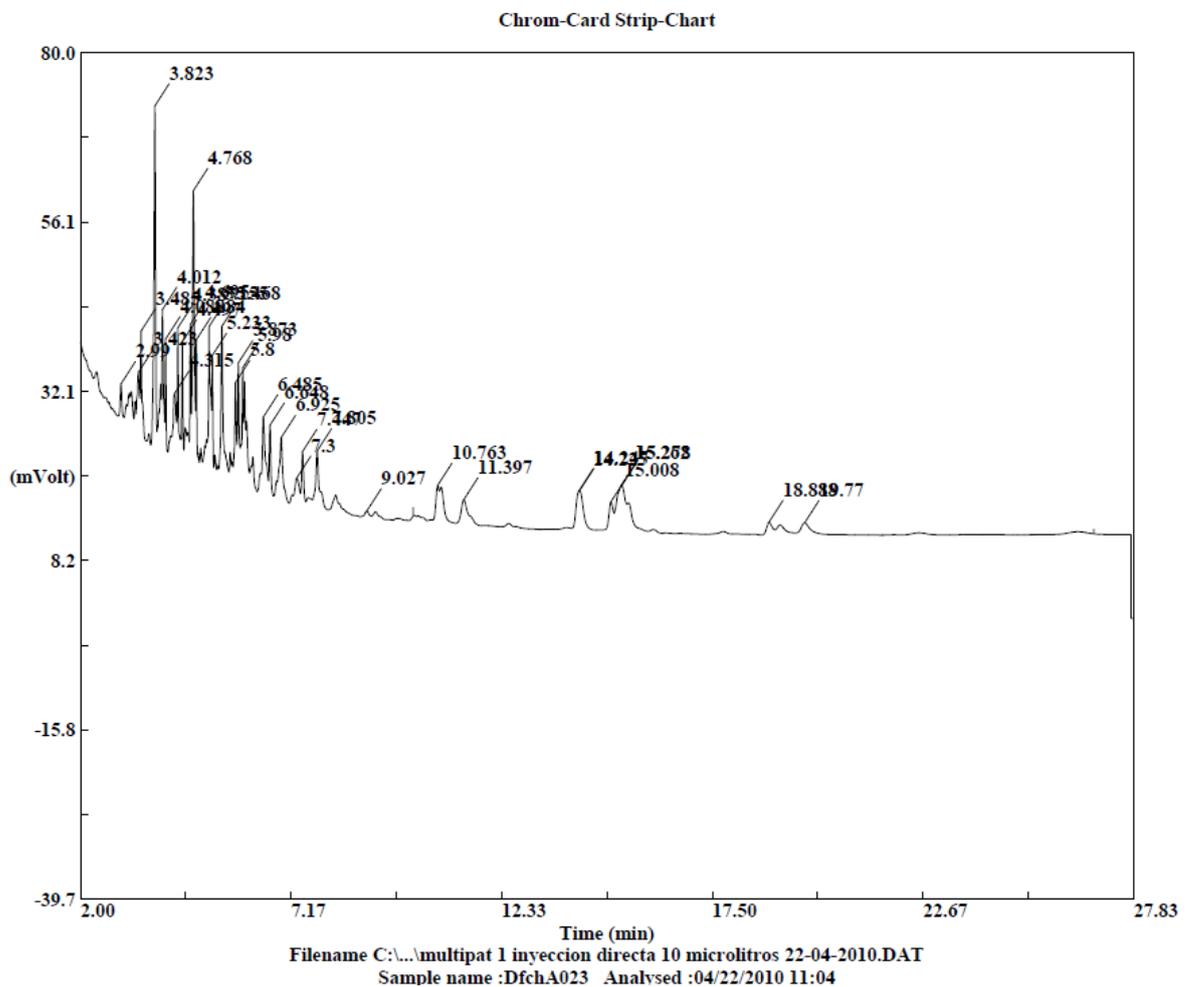


Figura N° 21. Inyección directa al cromatógrafo de gases de 10 μ L del multipatrón de 400 ppm.

Como no es posible observar claramente los compuestos presentes, se muestran a continuación 3 ampliaciones de dicho cromatograma (ver figuras 21-A, B y C), para así apreciar cómo se logró identificar los HAPs que han sido estudiados hasta el momento y otros que fueron reconocidos y ubicados al realizar la comparación de estos, con el orden de aparición que presentan los mismos en el cromatograma obtenido por Moreira Vaz ^[40], donde este autor empleó el método de HS-SPME-GC-MS. El cromatograma obtenido por este autor puede visualizarse posteriormente en la figura 22, página (74).

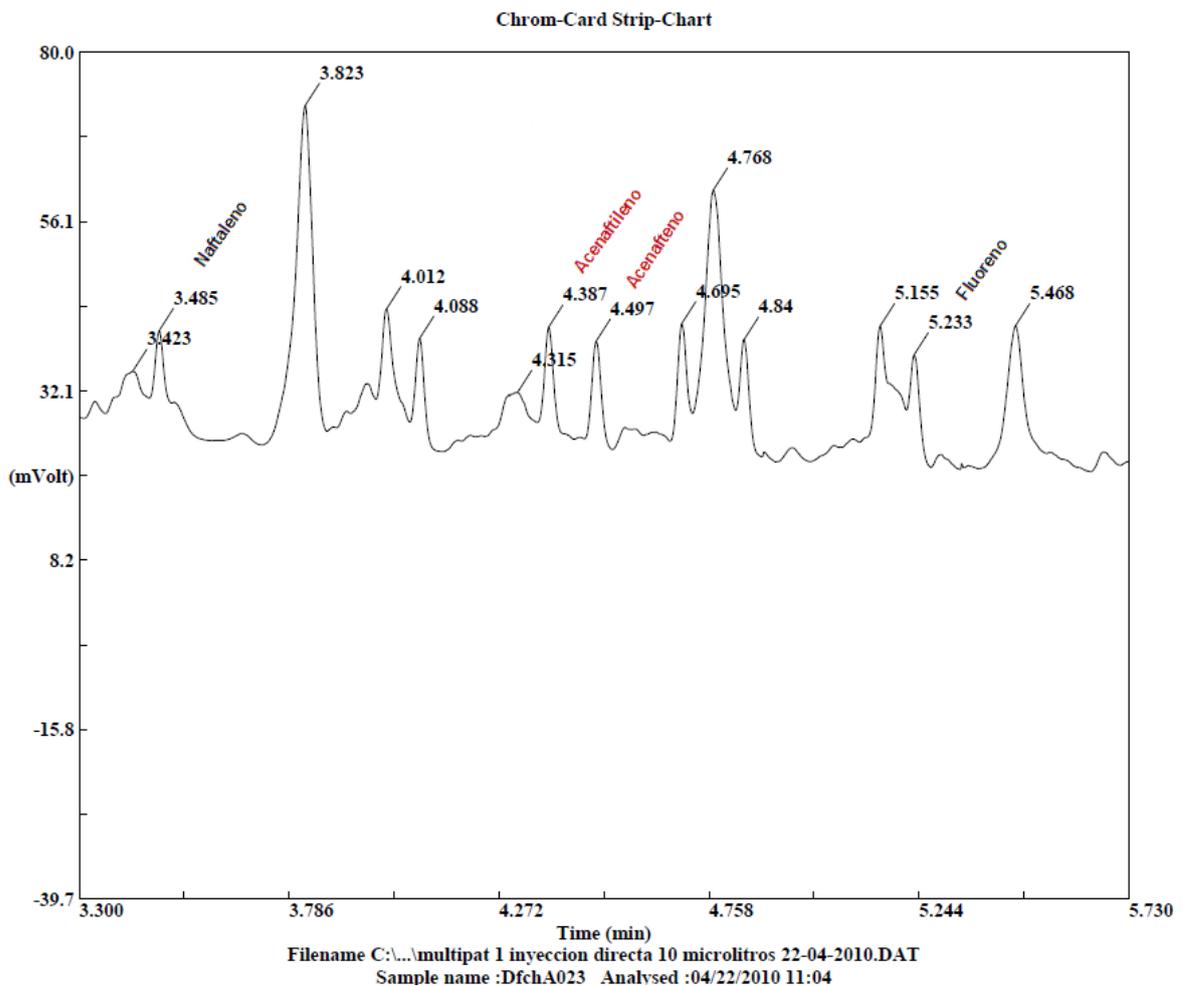


Figura N° 21-A. Inyección directa al cromatógrafo de gases de 10 μ L del multipatrón concentrado de 400 ppm (ampliación), rango de tiempo (3,30 – 5,73) min.

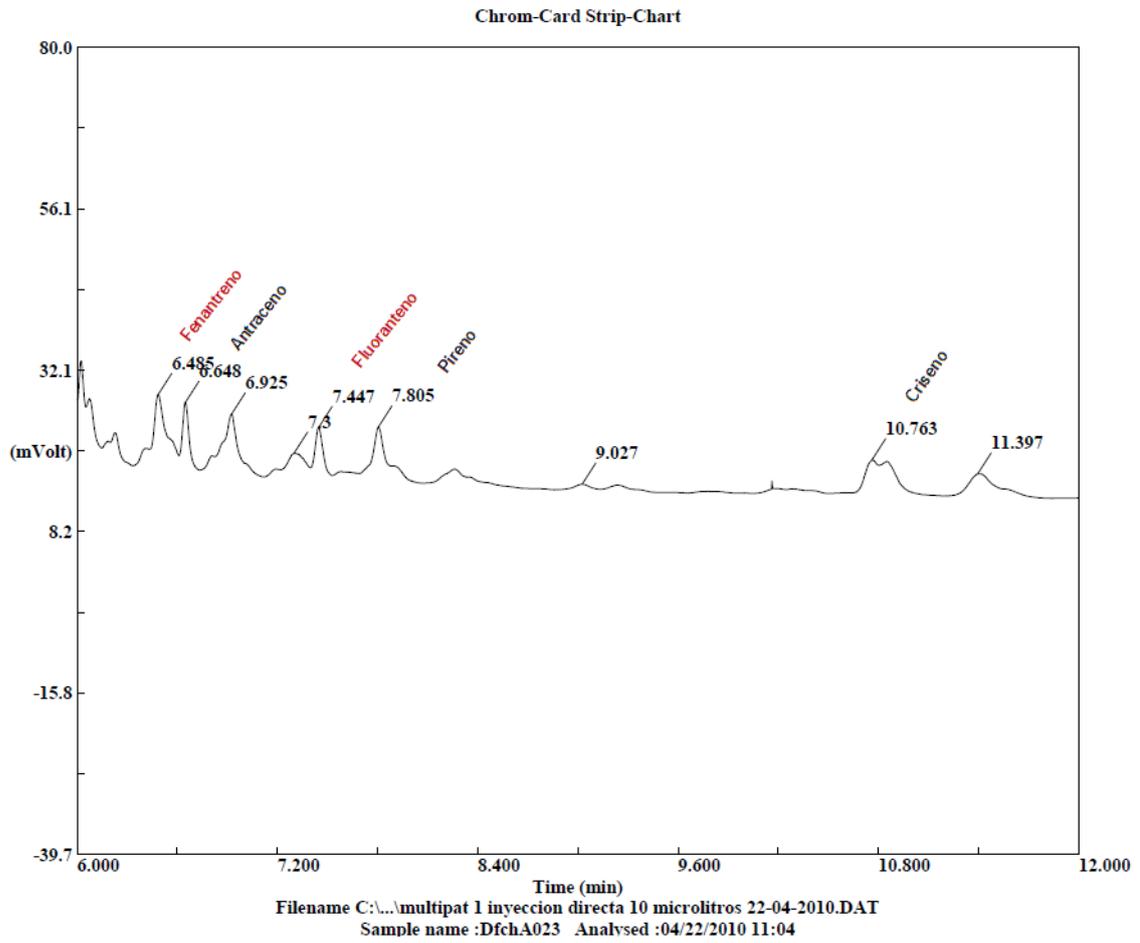


Figura N° 21-B. Inyección directa al cromatógrafo de gases de 10 μ L del multipatrón concentrado de 400 ppm (ampliación), rango de tiempo (6,00 – 12,00) min.

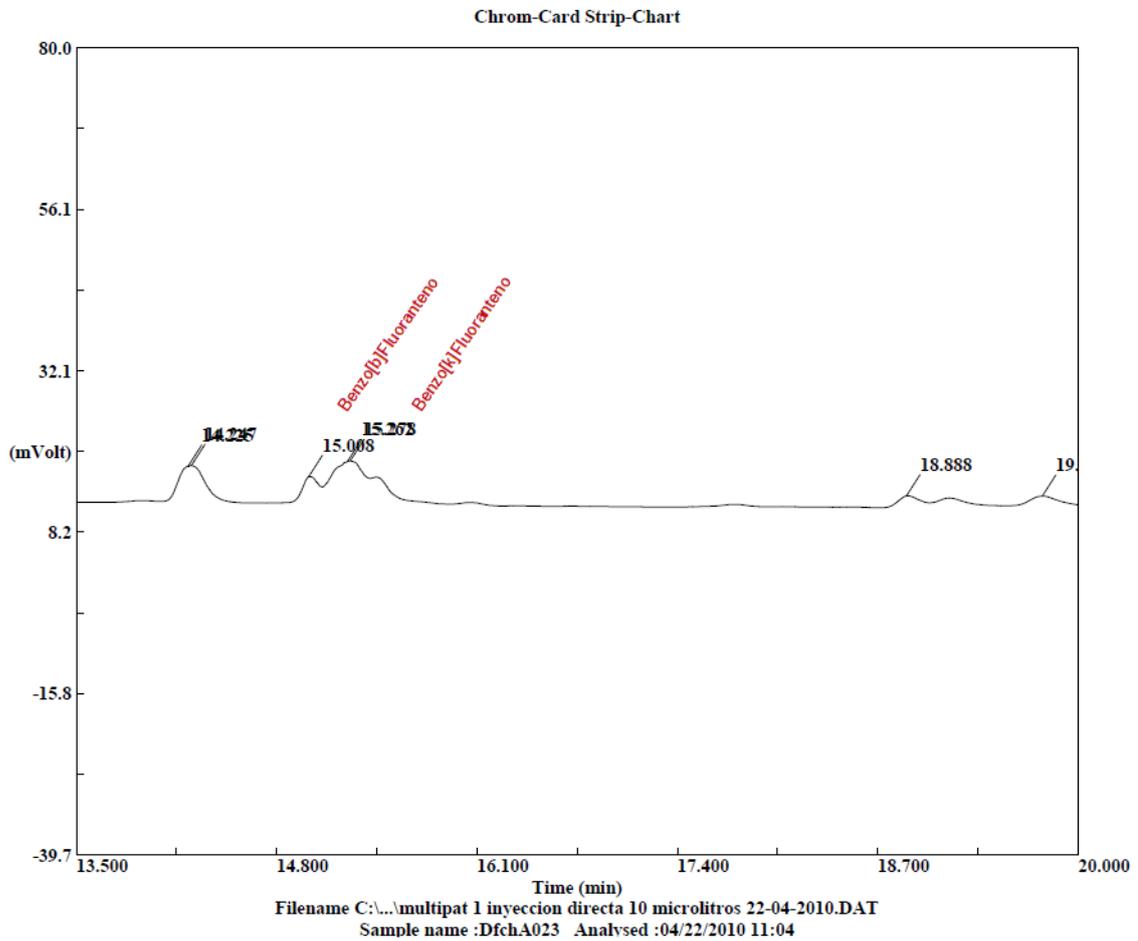


Figura N° 21-C. Inyección directa al cromatógrafo de gases de 10 μ L del multipatrón concentrado de 400 ppm (ampliación), rango de tiempo (13,50 – 20,00) min.

Por los resultados obtenidos se aprecia que estas condiciones empleadas permiten detectar 11 de los 16 HAPs seleccionados por la Agencia Federal para la Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos.

A continuación se muestra el cromatógrama obtenido por Moreira Vaz ^[40] empleado para identificar otros HAPs presentes en el estándar ver figura 22.

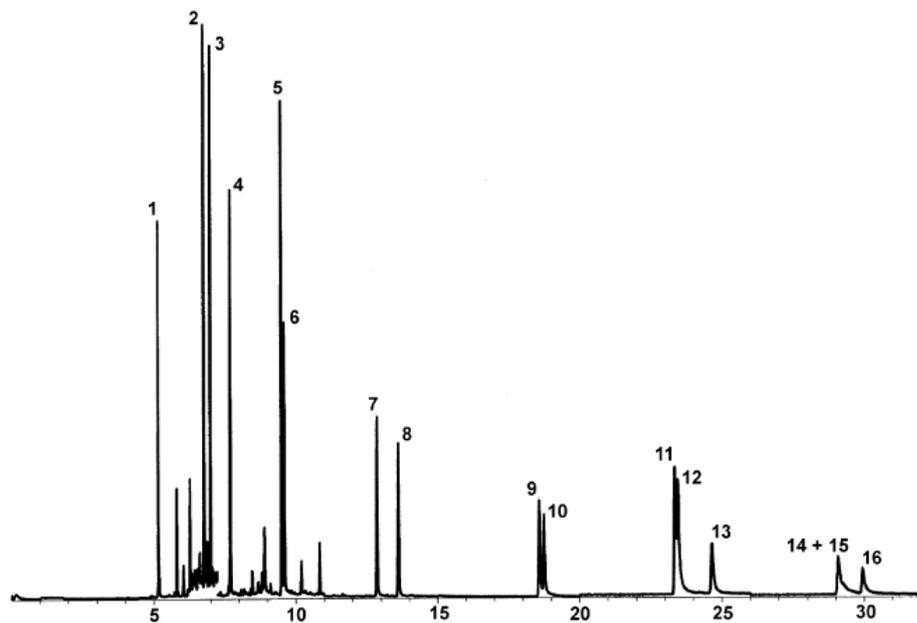


Fig. 1. Reconstructed SIM chromatogram for standard of PAHs obtained by HS-SPME (level 5 for reference curve). (1) Nap (24 pg); (2) Acy (120 pg); (3) Ace (120 pg); (4) Flu (120 pg); (5) Phe (120 pg); (6) Ant (120 pg); (7) Fla (120 pg); (8) Pyr (120 pg); (9) BaA (240 pg); (10) Cry (240 pg); (11) BbF (960 pg); (12) BkF (960 pg); (13) BaP (960 pg); (14, 15) Ind+DaA (9.6 ng each); and (16) BghiP (9.6 ng).

Figura N° 22. Cromatograma obtenido por Moreira Vaz, J. ^[40]

6.2.3.2. Evaluación de la fibra de 65 μm de PDMS-DVB, con el estándar de referencia.

Para verificar cuántos de estos hidrocarburos son detectados por la fibra de 65 μm de PDMS-DVB, se realizó una primera experiencia en donde se expuso 1,0000 g de silica contaminados con 100 μL del estándar de 20 ppm sin homogeneizar (es decir se colocó la silica dentro del vial y se le adicionó 100 μL del multipatrón, se cerró y luego se expuso la fibra al espacio confinado), a las condiciones de sorción y desorción indicadas en las secciones (6.2.2.1 y 6.2.2.2, páginas 66 y 67), el resultado obtenido se puede observar en la figura 23.

Tabla N° 16 Cantidad inyectada de los HAPs en estudio en 100 µL del estándar de 20 ppm.

HAPs	(C ± 1) (µg/g) · 10 ⁴
Naftaleno	20
Fluoreno	20
Antraceno	20
Pireno	20
Criseno	20

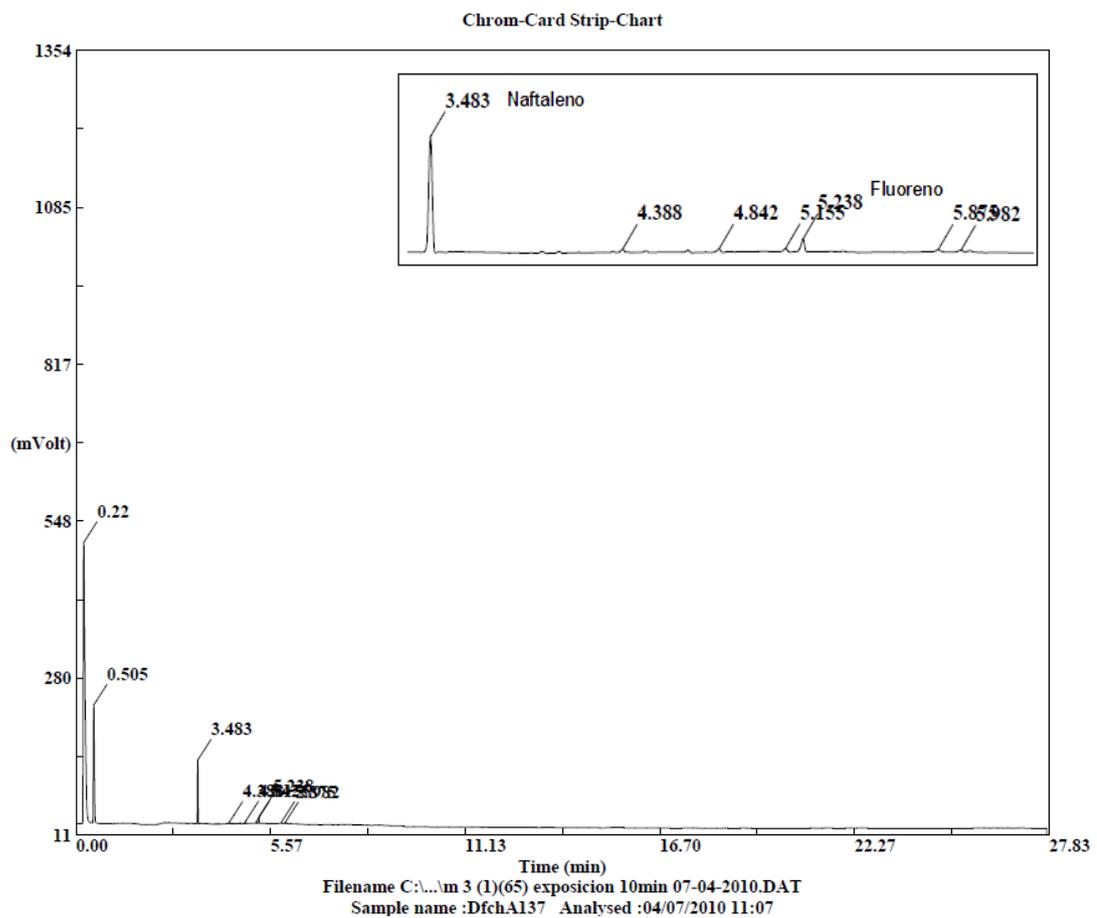


Figura N° 23. Silica + multipatrón (sin homogeneizar) obtenida por EC-MEFS-CG, con la fibra de 65 µm de PDMS-DVB.

No se logró observar claramente todos los componentes presentes en dicho multipatrón, en la figura sólo se identifican el naftaleno y el fluoreno. Por otra parte, se puede decir que el efecto de homogeneizar la muestra cumple un papel influyente en la detección de los compuestos en la misma, por lo que se procedió a realizar una nueva experiencia que involucrara este proceso con la intención de corroborar este hecho.

En esta experiencia se expuso la homogeneización de 1,0000 g de silica con 100 μ L del multipatrón de 20 ppm (el proceso de homogeneización se explico en la sección 6.2.1 página 59) esto fue realizado empleando igualmente las condiciones de sorción y desorción mencionadas en la página 67, de lo cual se obtuvo el siguiente cromatógrama (ver figura 24).

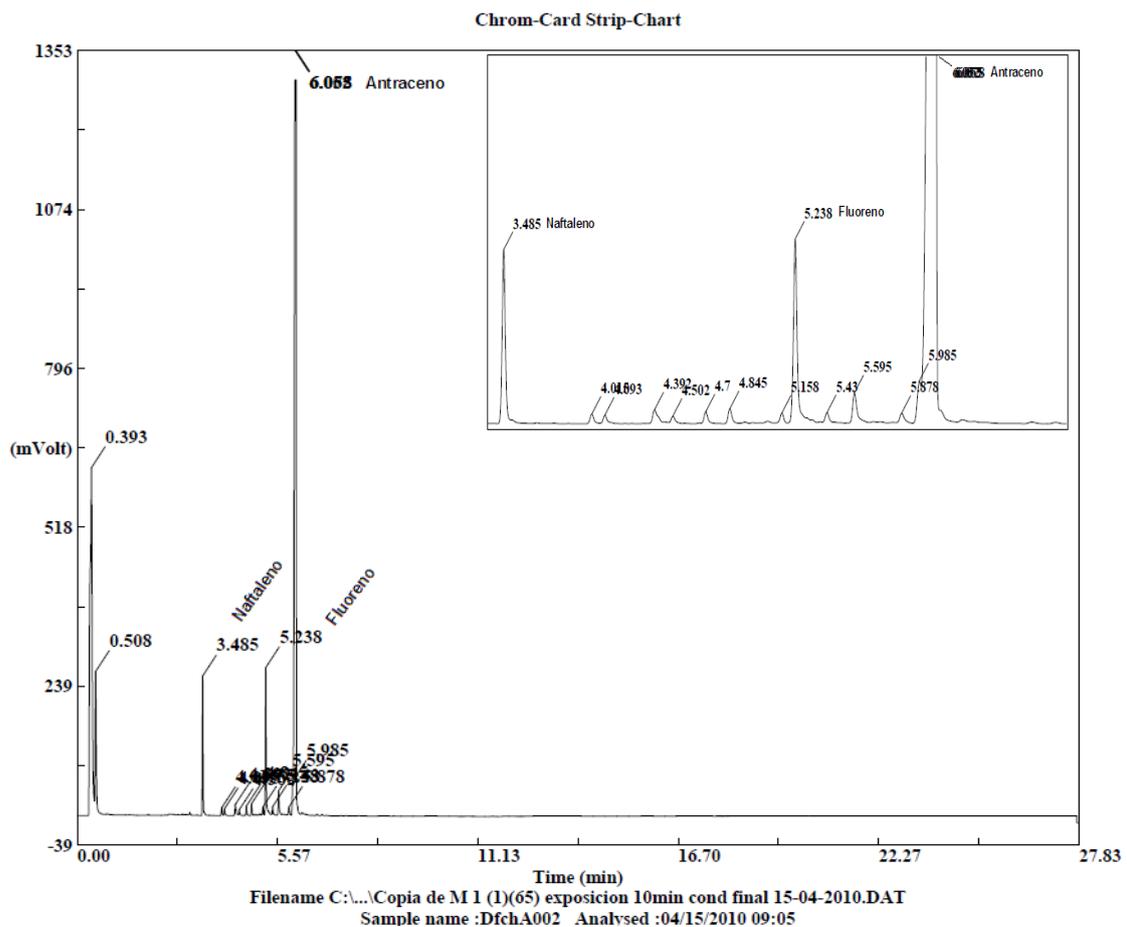


Figura N° 24. Silica + multipatrón (Homogeneización), obtenida por EC-MEFS-CG, con la fibra de 65 μ m de PDMS-DVB.

Se aprecia que el efecto de homogeneización influye en la sorción de los compuestos por la fibra, ya que al realizar esto, permite obtener una mayor cantidad de picos entre ellos los 3 HAPs correspondientes a los patrones sólidos empleados y observar los mismos con una mayor señal, algo que no fue visto en la experiencia realizada sin homogeneizar la muestra, donde sólo se lograron sorber sólo 2 de estos compuestos. Este hecho se explica debido a que al encontrarse distribuido el multipatrón de referencia en la sílica aumenta la difusión de los analitos desde la muestra hacia el espacio confinado y de éste a la fibra. A continuación se presenta la tabla nº 17, en la cual se realiza la comparación de áreas obtenidas para ambas experiencias y se sustenta lo anteriormente explicado.

Tabla N° 17. Comparación de áreas (sílica + multipatrón), sin homogeneizar y con homogeneización.

HAPs	Áreas	
	Sin Homogeneizar	Con Homogeneización
Naftaleno	1.263.811	3.371.441
Fluoreno	145.798	4.290.764
Antraceno	-----	12.616.080

6.2.3.3. Confirmación de compuestos sorbidos por la fibra de 65 μm de PDMS-DVB, empleando la mezcla de patrones puros (III).

Con la intención de confirmar que estos picos correspondan a los respectivos patrones sólidos empleados, se elaboró la mezcla de patrones puros (III), la cual posee la siguiente composición ver tabla n° 18:

Tabla N° 18. Proporciones de los patrones puros empleados para elaborar la mezcla (III).

Patrón de HAPs	(Masa \pm 0,0001) g	% P/P \pm 0,01	(Concentración \pm S) ($\mu\text{g/g}$) $\cdot 10^{-3}$
Naftaleno	0,0305	3,78	38 \pm 4
Fluoreno	0,0252	3,13	31 \pm 3
Antraceno	0,7504	93,09	931 \pm 93

Para el estudio en cuestión se elaboró la muestra sintética C constituida por la homogeneización de 0,0100 g de la mezcla (III) + 0,9900 g de silica + 100 μL del multipatrón de 20 ppm. La concentración a la cual se encuentran los patrones en dicha muestra, se puede apreciar en la tabla n° 19.

Tabla N° 19 Concentración de los HAPs contenidos en la muestra sintética C.

Patrón	(Concentración \pm S) ($\mu\text{g/g}$) $\cdot 10^{-3}$
Naftaleno	0,38 \pm 0,04
Fluoreno	0,31 \pm 0,03
Antraceno	9,31 \pm 0,94

Esta experiencia para identificar los picos en cuestión, consistió en mezclar 0,0100 g de la mezcla (III), con 100 μ L del multipatrón de 20 ppm y estos a su vez homogeneizados con 0,9900 g de silica. El cromatógrama obtenido para ésta prueba puede ser observado en el apéndice 1 figura (A.1-3), donde se puede apreciar que la señal de los picos correspondientes al naftaleno y al fluoreno aumentan, algo que no ocurre con el antraceno y es confirmado a continuación en la tabla (n° 20) donde se aprecia la comparación de las áreas obtenidas para cada compuesto en las 2 últimas experiencias realizadas.

Tabla N° 20. Comparación de áreas (silica + multipatrón) y (silica + multipatrón + mezcla (III)).

HAPs	Áreas	
	Silica + multipatrón	Muestra sintética C (silica + multipatrón + mezcla III)
Naftaleno	3.371.441	6.357.910
Fluoreno	4.290.764	7.379.390
Antraceno	12.616.080	616.660

Como podemos observar el área correspondiente al antraceno disminuyó cuando se esperaba que este aumentara así como ocurrió para los otros hidrocarburos, para explicar este hecho nos basamos en 2 suposiciones, la primera tiene que ver con las isotermas de Langmuir ^[41], donde podría entenderse que la fibra adsorbe las moléculas de antraceno, a medida que aumenta la concentración de éste, hasta alcanzar un valor límite que es cuando se ocupan todas las posiciones de la superficie sólida y ésta no es capaz de sorber más analito y debido a esto es que no apreciamos el aumento en el área de dicho compuesto, (para

mayor información sobre la isoterma de Langmuir la cual corresponde a una adsorción en monocapa ver apéndice 2.

Por otra parte, la segunda suposición tiene que ver con la homogeneización de la muestra ya que al no realizar este proceso correctamente la distribución del patrón no sería la adecuada para aumentar la difusión de los analitos desde la matriz de la muestra hacia el espacio confinado y de este a la fibra. Lo que provoca que disminuya la concentración de los compuestos en el espacio confinado y por ende la disminución de la cantidad de analito sorbida por la fibra. ^[16 y 42]

De las experiencias realizadas se pudo apreciar además que no se observan picos correspondientes a los HAPs luego de un ($t_R = 6$ min), por lo que se procedió a aplicar la programación de temperatura (ver tabla n° 21), utilizada por Moreira Vaz^[40], con la intención de lograr observar los HAPs que posean mayor punto de ebullición, ya que el correspondiente al último compuesto detectado (antraceno) es de 340 °C.

Tabla N° 21. Programación de temperatura empleada por Moreira Vaz, J ^[40].

	Temperatura (°C)	Velocidad de calentamiento (°C/min)	Tiempo (min)	Tiempo de corrida (min)
Inicial	45	0	1	1
Rampa 1	190	30	0	4,13
Rampa 2	300	5	10	22,7
Tiempo total de corrida (min)				37,83

Este autor emplea una temperatura del puerto de inyección de 260 °C y de 300 °C en el detector, con la intención de volatilizar los HAPs más pesados y poder detectarlos así.

Para verificar estas nuevas condiciones, se procedió a realizar la homogeneización de 1,0000 g de silica con 100 µL del multipatrón de 20 ppm a las

condiciones de sorción y desorción establecidas y a continuación se muestra una ampliación del cromatograma obtenido (ver figura 25).

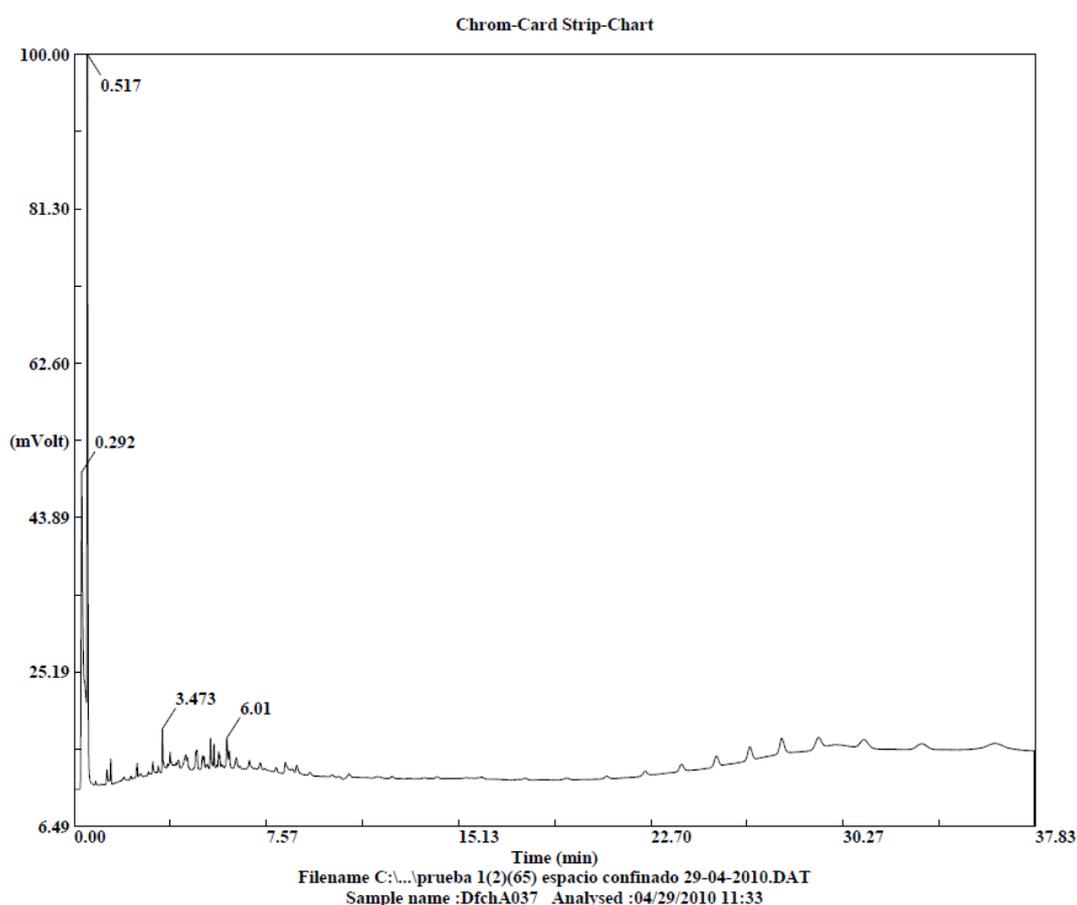


Figura N° 25. Silica + multipatrón de referencia, condiciones de Moreira Vaz ^[40] (Escala ampliada), obtenido por EC-MEFS-CG, con la fibra de 65 μm de PDMS-DVB.

Se observa que a pesar de aumentar la temperatura para que la desorción de la mayor cantidad de HAPs sea completa, de igual manera no aparecen picos (luego de un $t_R = 6$ min), sino que aparece un fenómeno a partir de un ($t_R = 22$ min), en donde se observan una serie de picos que son característicos del fenómeno de sangrado de la columna (es decir el proceso de vaporización y descomposición de la fase estacionaria que se produce al trabajar a altas temperaturas) ^[20, 21 y 43] así como de posibles contaminantes que puedan estar presentes en la misma, por lo que esto

fue corroborado al realizar la inyección directa al cromatógrafo de gases de 2 μL de acetonitrilo para estas condiciones, y es mostrado a continuación en una ampliación del mismo (ver figura 26).

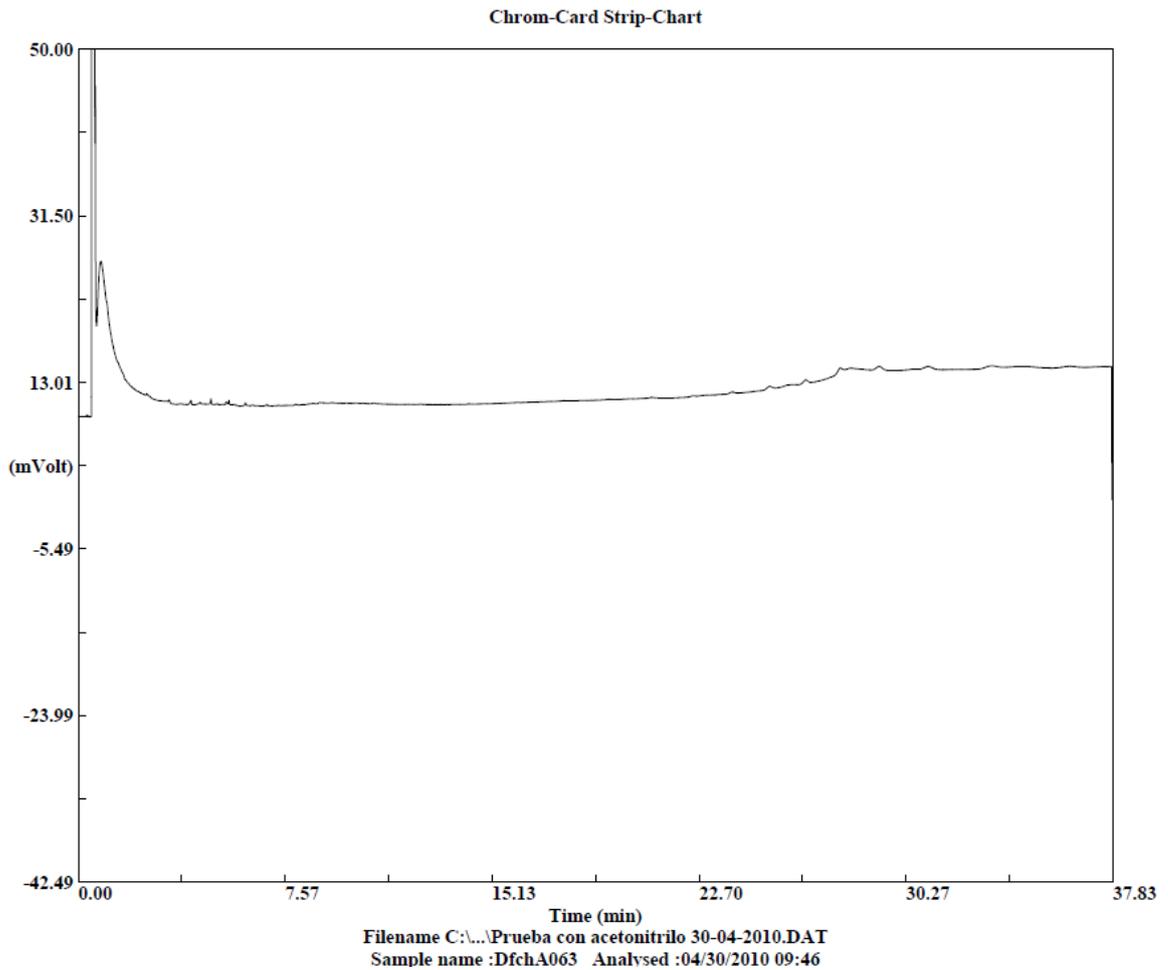


Figura N° 26. Inyección directa de 2 μL de acetonitrilo (Escala ampliada)

Como se puede observar se suman ambos efectos indicados anteriormente y esto lo explica Mc Nair ^[43], quien nos muestra una interpretación de este fenómeno y puede ser visto a continuación en la (figura 27).

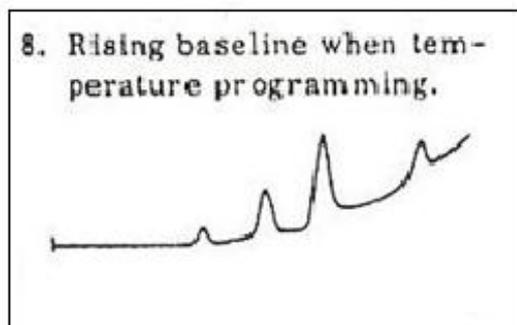


Figura N° 27. Sangrado de la columna + posibles contaminantes presentes. ^[43]

De lo anteriormente visto y explicado se concluye que estas condiciones no serán empleadas ya que afectan el grado de separación de la columna y nos llevaría a resultados erróneos, por lo que a continuación se muestran las condiciones a emplear para el método de EC-MEFS-CG (ver tabla n° 7 página (57) y tabla n° 22).

Tabla N° 22. Condiciones de sorción y desorción por EC-MEFS-CG.

Sorción	Tiempo (min)		Temperatura (°C)
		60	
Desorción	Tiempo (min)	Temperatura del puerto de inyección (°C)	Temperatura del detector (°C)
	10	260	300

6.2.3.4. Estudio de otros compuestos.

Dado a que posteriormente se logro conseguir patrones correspondientes a los siguientes HAPs: Benzo(a)pireno, Pireno y Criseno; se realizaron nuevas experiencias donde estuviesen involucrados los mismos a fin de que estos nuevos patrones se adaptaran a las condiciones ya establecidas. En principio se realizó la inyección directa al cromatógrafo de gases de 2 μ L de Benzo(a)pireno el cual se encuentra disuelto en acetonitrilo; con la intención de ubicar al compuesto considerado marcador de los HAPs cancerígenos (como se mencionó en el capítulo 1, página 1), el resultado obtenido se muestra en el siguiente cromatógrama (ver figura 28).

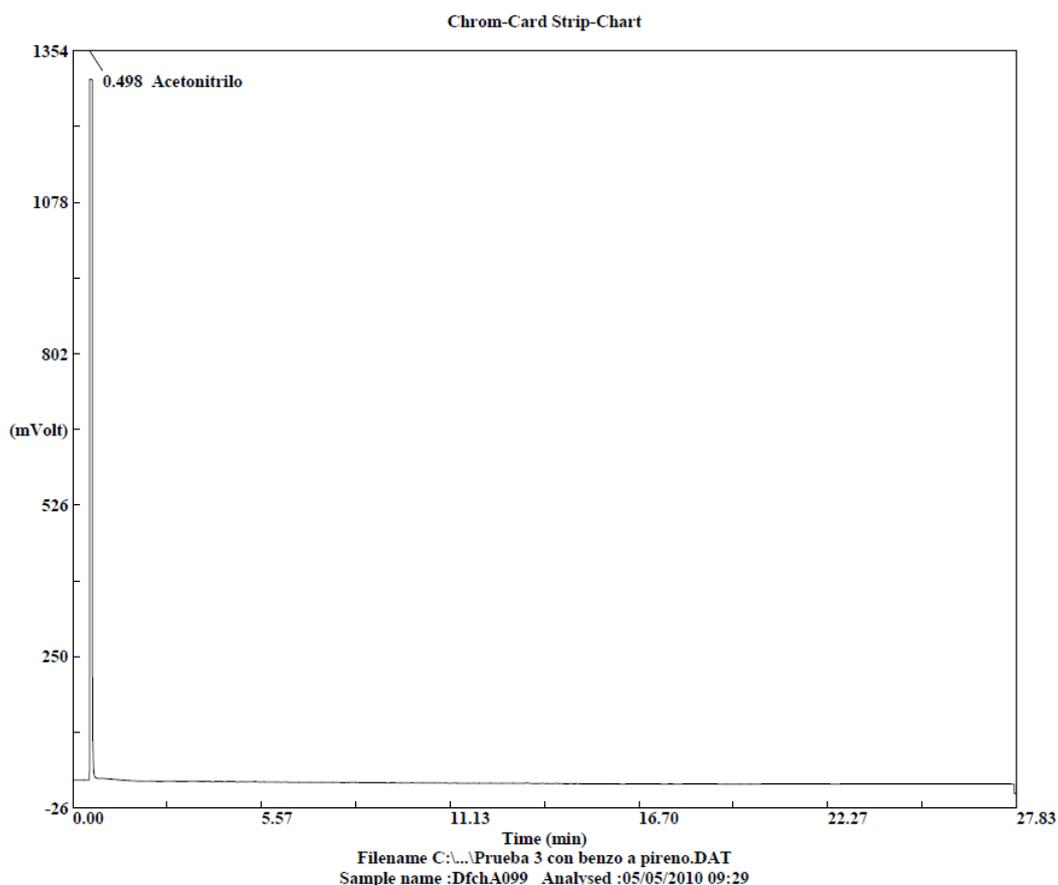


Figura N° 28. Inyección directa al cromatógrafo de gases de 2 μ L de Benzo(a)pireno.

Se aprecia que para estas condiciones no se observa el pico correspondiente al Benzo(a)pireno (Peso molecular 252,3093 g/mol; punto de ebullición 495 °C), únicamente se observa el correspondiente al solvente donde está disuelto el mismo, lo que nos indica que éstas no nos permiten ubicar el pico correspondiente al marcador de los HAPs cancerígenos.

Posteriormente se realizaron pruebas para ubicar el tiempo de retención en que aparecen tanto el criseno (Peso molecular 228,2879 g/mol; punto de ebullición 448 °C) como el pireno (Peso molecular 202,2506 g/mol; punto de ebullición 404 °C), que como se puede observar poseen peso molecular y punto de ebullición inferior al Benzo(a)pireno y así verificar si estos compuestos se pueden detectar. Para ello se intentaron disolver dichos compuesto en acetonitrilo pero la disolución resultó ser negativa, por lo que se empleó una mezcla acetonitrilo/acetato de etilo, en la cual se lograron disolver los mismos y a continuación se muestran los cromatógramas obtenidos para ambos patrones por separado (ver figuras 29 y 30).

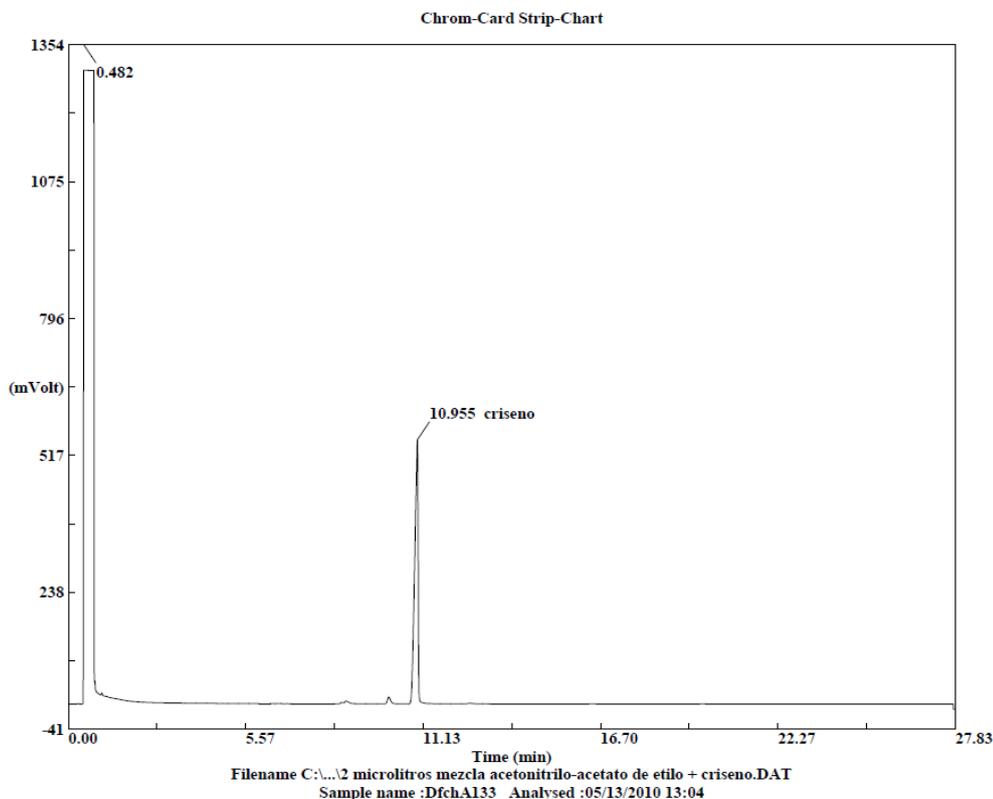


Figura N° 29. Criseno disuelto en mezcla acetonitrilo/acetato de etilo.

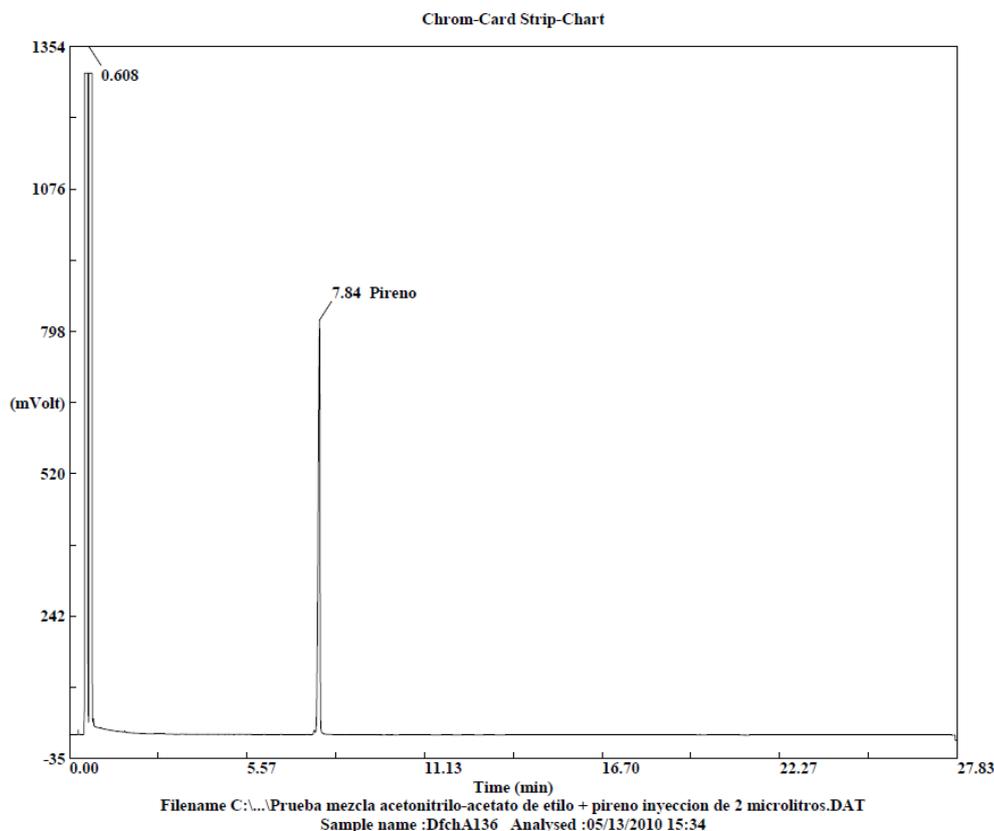


Figura N° 30. Pireno disuelto en mezcla acetonitrilo/acetato de etilo.

Se observa que estos compuestos son detectados a las condiciones empleadas, por lo que tomamos estos datos como referencia de ahora en adelante en el presente trabajo.

Debido a que ya se posee información referente a otros patrones de HAPs, se procedió a realizar una nueva experiencia que los involucrara a todos, para observar el comportamiento de la fibra de 65 μm de PDMS-DVB frente a estos, es por ello que se preparó la mezcla de patrones puros (IV) la cual posee la composición mostrada en la tabla (n° 23), y a partir de esta se elaboró la muestra sintética D, y el cromatograma obtenido para este estudio se puede observar luego en la figura (31).

6.2.3.4.1 Evaluación de la mezcla de patrones puros (IV) y elaboración de la muestra sintética D

Esta mezcla de patrones puros (IV) fue elaborada con los patrones sólidos que ya se disponían y además se le agregó otros como: pireno y criseno, para evaluar el comportamiento de los mismos con la fibra empleada, a continuación se muestran características correspondientes a dicha mezcla ver tabla (n° 23).

Tabla N° 23. Proporciones de los patrones puros empleados para elaborar la mezcla (IV).

Patrón de HAPs	(Masa $\pm 0,0001$) g	% P/P $\pm 0,02$	(Concentración $\pm S$) ($\mu\text{g/g}$) $\cdot 10^{-3}$
Naftaleno	0,0305	3,63	36 \pm 4
Fluoreno	0,0251	2,98	30 \pm 3
Antraceno	0,7502	89,20	892 \pm 89
Pireno	0,0251	2,98	30 \pm 3
Criseno	0,0101	1,20	12 \pm 2

Para el estudio en cuestión se elaboró la muestra sintética D constituida por la homogeneización de 0,0100 g de la mezcla (IV) + 0,9900 g de silica. Los valores de concentración a la cual se encuentran los patrones en dicha muestra se pueden apreciar en la tabla n° 24.

Tabla N° 24. Concentración de los HAPs contenidos en la muestra sintética D (producto de homogeneizar 0,0100 g de la mezcla (IV) con 0,9900 g de silica).

Patrón	(Concentración \pm S) ($\mu\text{g/g}$) \cdot 10⁻³
Naftaleno	0,36 \pm 0,04
Fluoreno	0,30 \pm 0,03
Antraceno	8,9 \pm 0,9
Pireno	0,30 \pm 0,03
Criseno	0,12 \pm 0,02

Tabla N° 25. Resultados obtenidos para la muestra sintética (D), empleando la fibra de 65 μm de PDMS-DVB.

HAPs	t_R(min)	Área
Naftaleno	3,47	10.396.780
Fluoreno	5,23	8.958.953
Antraceno	6,04	1.324.034
Pireno	7,79	4.320.451

A continuación se muestra el cromatograma obtenido (ver figura 31), para la muestra sintética (D).

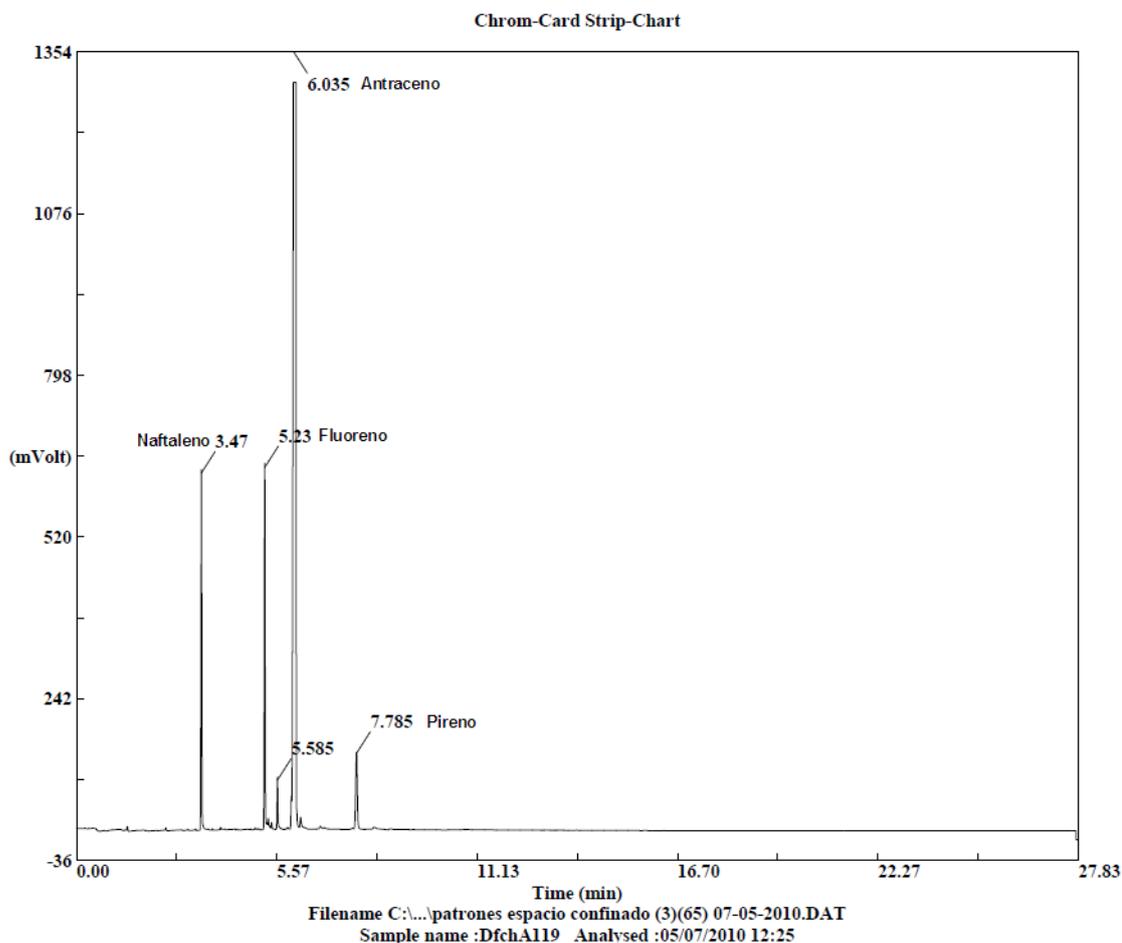


Figura N° 31. Muestra sintética D, obtenido por EC-MEFS-CG, con la fibra de 65 μm de PDMS-DVB.

Como se logra observar el único pico que no aparece reflejado es el correspondiente al criseno. El último hidrocarburo detectado fue el pireno el cual posee un punto de ebullición de 404 °C, lo que nos hace pensar que en el proceso de EC-MEFS-CG, sólo se pueden detectar los HAPs considerados más volátiles, es decir para nuestro caso los que posean un punto ebullición igual o inferior a 404 °C, esto fue obtenido de igual forma por Viñas y col ^[30] donde estos proponen como regla general que la técnica de EC-MEFS sólo puede detectar los HAPs más livianos o de menor punto de ebullición, asimismo Aguinaga y col ^[31], indican que compuestos pesados o de alto punto ebullición no son detectados por dicha técnica

en cuestión, ya que la misma sólo es capaz de detectar aquellos compuestos que posean hasta 4 anillos. En cuanto al criseno que posee esta cantidad de anillos mencionada se piensa que no pudo ser detectado debido a dos posibilidades la primera es que éste compuesto debe encontrarse en una baja concentración para no ser sorbido por la fibra motivo por el cual no pudo ser detectado, ya que la cantidad de moléculas extraídas por la fibra depende de la concentración de la muestra y la segunda posibilidad tiene que ver con la disposición en que se encuentran los anillos en su estructura ya que pudiese existir algún tipo de impedimento para que esta pueda adherirse a la fibra.

Para corroborar que la fibra pueda sorber estos nuevos HAPs en el multipatrón, se realizó una experiencia empleando 20 μL del patrón (concentrado) de 400 ppm homogeneizado con 1,0000 g de silica, también con el fin de verificar hasta qué punto es capaz de sorber la misma, el resultado obtenido se puede apreciar en la figura 32.

Tabla N° 26. Cantidad inyectada de los HAPs en estudio en 20 μL del estándar de 400 ppm.

HAPs	$(C \pm 4) (\mu\text{g/g}) \cdot 10^4$
Naftaleno	80
Fluoreno	80
Antraceno	80
Pireno	80
Criseno	80

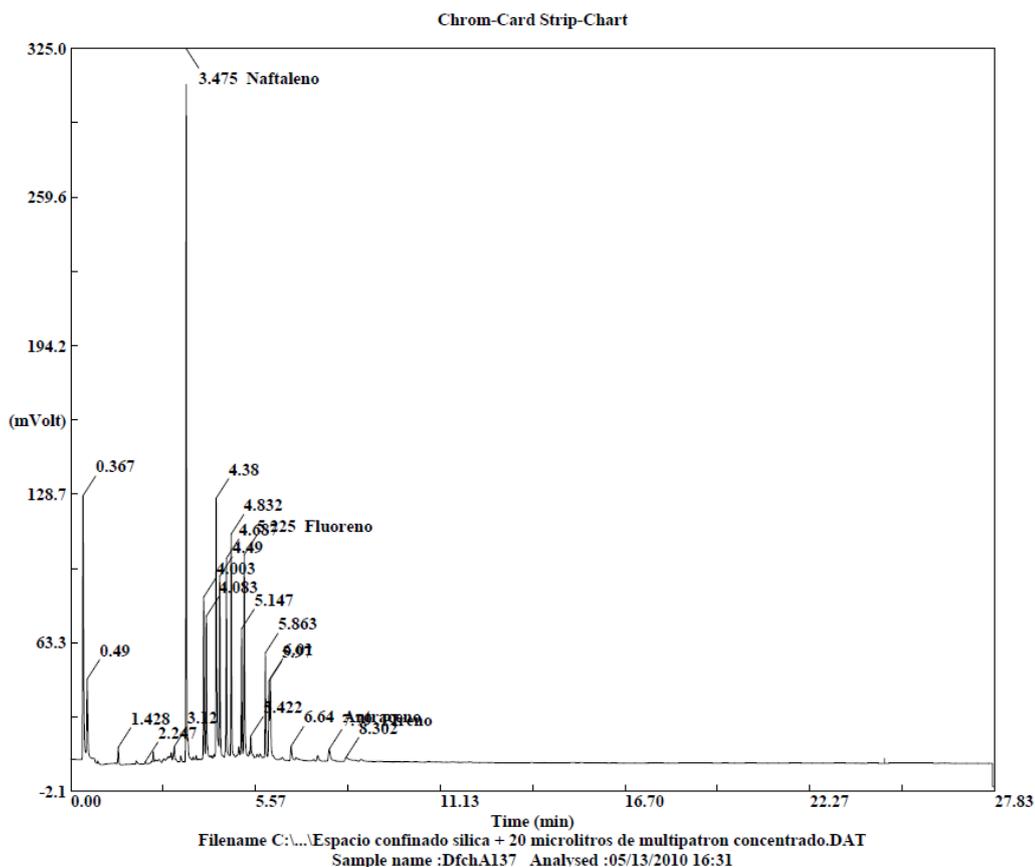


Figura N° 32. Hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en el mutipatrón de 400 ppm, obtenido por EC-MEFS-CG con la fibra de 65 μm de PDMS-DVB.

Para observar con más detalle se presenta a continuación una ampliación del cromatógrama en un rango de tiempo de (2,00 – 8,50) min, (ver figura 32-A), en donde se presenta la identificación de los HAPs estudiados así como de otros hidrocarburos, realizado la comparación con el orden de aparición que presentan los mismos en el cromatógrama obtenido por Moreira Vaz, J.^[40], el cual empleó HS-

SPME-GC-MS y se pudo apreciar en la figura 22 mostrada en la página (73).

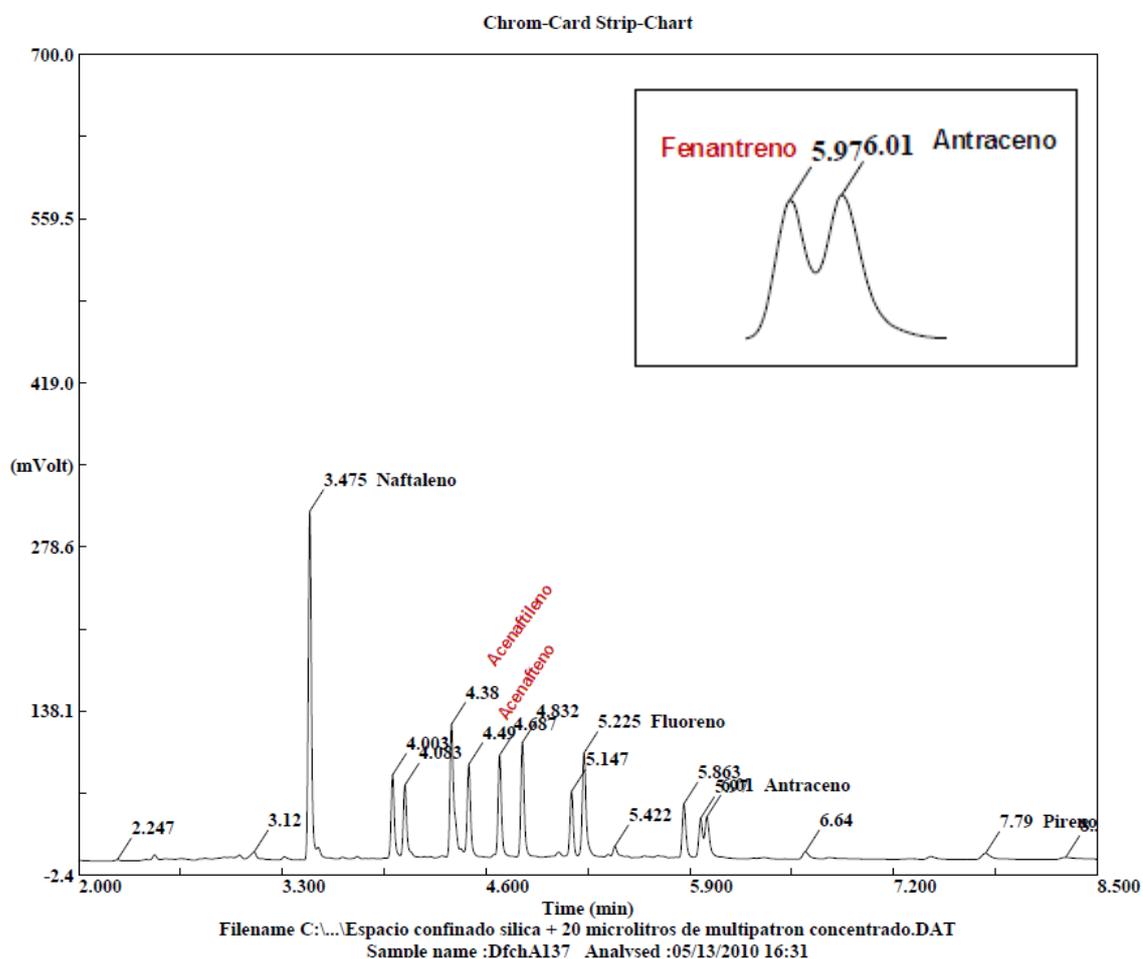


Figura N° 32-A. Hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en el mutipatrón de 400 ppm, sorbidas por la fibra de 65 μm de PDMS-DVB (Rango de tiempo (2,00 – 8,50) min).

Se aprecia que a pesar de emplear el multipatrón concentrado no se logran observar picos que posean un tiempo de retención superior al minuto ocho (8), lo que efectivamente nos demuestra que el proceso de EC-MEFS-CG sólo puede detectar los HAPs más volátiles (es decir la fibra de 65 μm de PDMS-DVB sólo pudo ser capaz de sorber en nuestro caso hasta el pireno el cual posee un punto de ebullición de 404 °C, el criseno no pudo ser sorbido por la fibra en cuestión empleando esta técnica). Además como se mencionó anteriormente se realizó una posible identificación de otros hidrocarburos presentes en este rango de tiempo, por

lo que se puede concluir que la técnica de EC-MEFS-CG es capaz de detectar hasta 9 de los 16 HAPs seleccionados por la Agencia Federal para la Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos ya que estos se ubican precisamente en este rango de tiempo es decir de (0-11) min, y para ello los mismos deben encontrarse en concentraciones adecuadas para ser sorbidas por la fibra en cuestión.

6.3 Estudio por ID-MEFS-CG.

La técnica de microextracción en fase sólida por inmersión directa es empleada con la intención de determinar aquellos HAPs que poseen alto punto de ebullición (es decir valores por encima de 404 °C que es el valor reportado de punto de ebullición para el pireno y el cual fue el último compuesto sorbido por la fibra empleada, en el caso de EC-MEFS-CG), para ello se tomó como referencia el procedimiento empleado por Aguinaga, N^[31], mostrado en la sección (5.4.2.2 página 54).

6.3.1 Selección de las condiciones óptimas de sorción y desorción de los HAPs por ID-MEFS-CG.

6.3.1.1. Selección de las condiciones de extracción de los HAPs.

Considerando que la fibra de 65 µm de PDMS-DVB fue la que brindó los mejores resultados para el caso de EC-MEFS-CG, se continuó empleando la misma para la determinación de los HAPs por la técnica de ID-MEFS-CG.

Para determinar cual solvente permite extraer la mayor cantidad de los HAPs en estudio se evaluaron: acetonitrilo y una mezcla 1:1 de acetonitrilo/acetato de etilo, y a continuación se muestran los resultados obtenidos para ambos.

6.3.1.2 Optimización del solvente a emplear.

El primer solvente estudiado fue el acetonitrilo del cual se empleó 8 mL para realizar la extracción de los hidrocarburos, tal como se mencionó en la sección (5.4.2.2 página 54). Considerando que se diluía demasiado la muestra, se procedió a disminuir tanto el volumen de extracción del solvente, así como la cantidad en masa de silica empleada para la homogeneización, por lo que a continuación se muestra el cromatógrama obtenido (ver figura 33), para 0,3000 g de silica homogeneizados con 100 μ L del multipatrón de 20 ppm y extraídas con 3 mL de acetonitrilo:

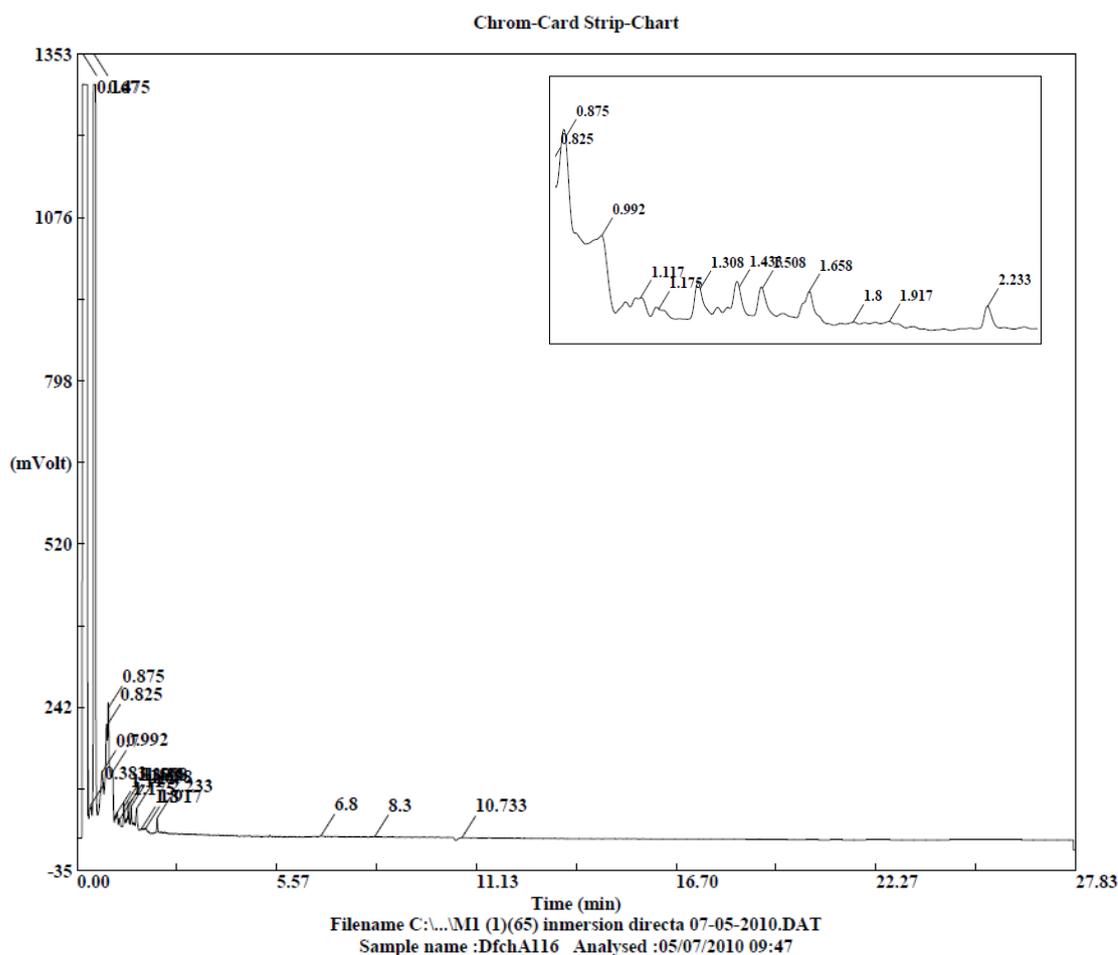


Figura N° 33. Silica + multipatrón 20 ppm obtenidos por ID-MEFS-CG con la fibra de 65 μ m de PDMS-DVB, programación de temperatura empleada por Mendoza, K. ^[18].

Lo observado indica que el acetonitrilo no permite extraer los HAPs y se puede notar en la ampliación realizada que únicamente se obtiene la deformación que presenta el pico del solvente al aproximarse a la línea base, por lo que se descarta realizar la extracción de los hidrocarburos con este solvente, dado esto y en cuestión de haber obtenido los patrones adicionales de HAPs (pireno y criseno) y realizadas las pruebas de solubilidad de estos (en la mezcla acetonitrilo/acetato de etilo) y mostrada en la sección (6.2.3.4 páginas 84 y 85) correspondiente a EC-MEFS-CG, se continuó con la optimización del parámetro en cuestión realizando una extracción con la mezcla de solventes mencionada.

A continuación se muestra el cromatógrama obtenido (ver figura 34), para 0,3000 g de silica homogeneizados con 50 μ L del multipatrón de 400 ppm, extraídas con 3 mL de la mezcla acetonitrilo/acetato de etilo:

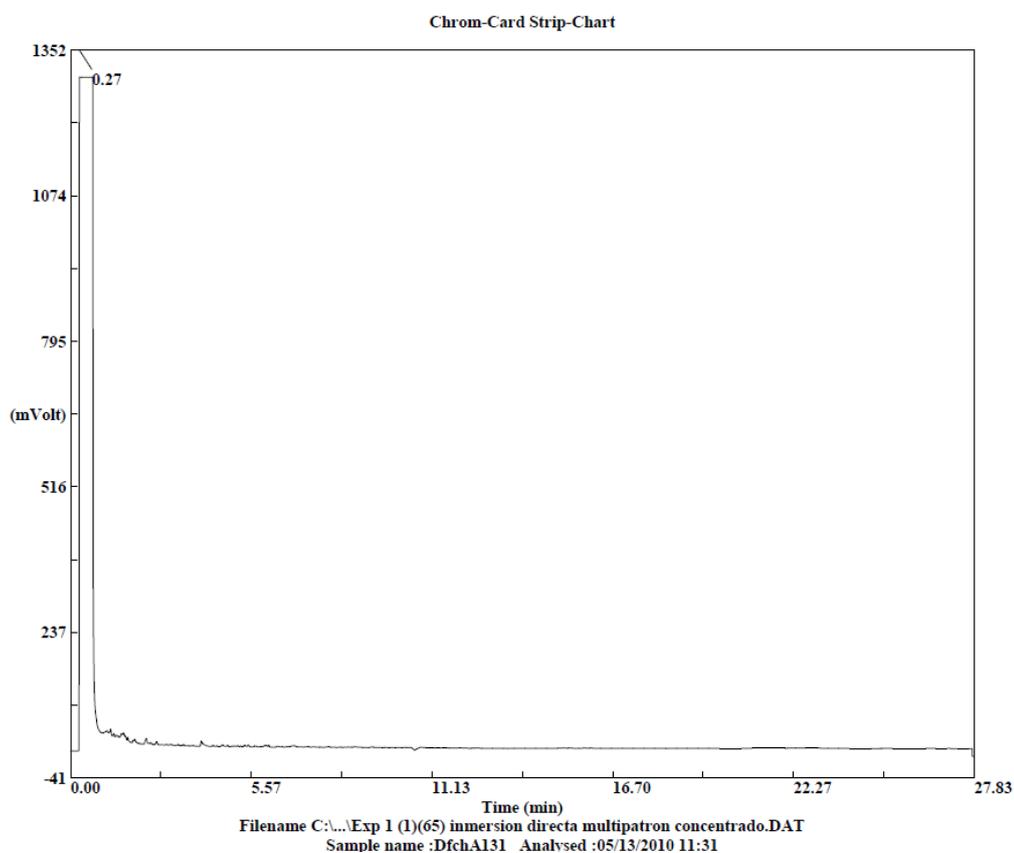


Figura N° 34. Silica + multipatrón de 400 ppm, obtenido por ID-MEFS-CG con la fibra de 65 μ m de PDMS-DVB (Homogeneización).

Tabla N° 27. Cantidad inyectada de los HAPs en estudio en 50 μ L del estándar de 400 ppm.

HAPs	(C \pm 1) (μg/g) \cdot 10³
Naftaleno	67
Fluoreno	67
Antraceno	67
Pireno	67
Criseno	67

Como se apreció no se logró observar los picos correspondientes a los HAPs, por lo que para verificar que dicha mezcla extrajera los compuestos en sí, se realizó la inyección directa al cromatógrafo de gases de 20 μ L de la muestra remanente (es decir la extracción se realizó con 3 mL de la mezcla de solventes, de ésta se tomó 2 mL los cuales fueron trasvasados al vial de MEFS, y del resto de la muestra se tomaron los 20 μ L, los cuales se inyectaron directamente al cromatógrafo de gases), a continuación se muestra el resultado obtenido (ver figura 35).

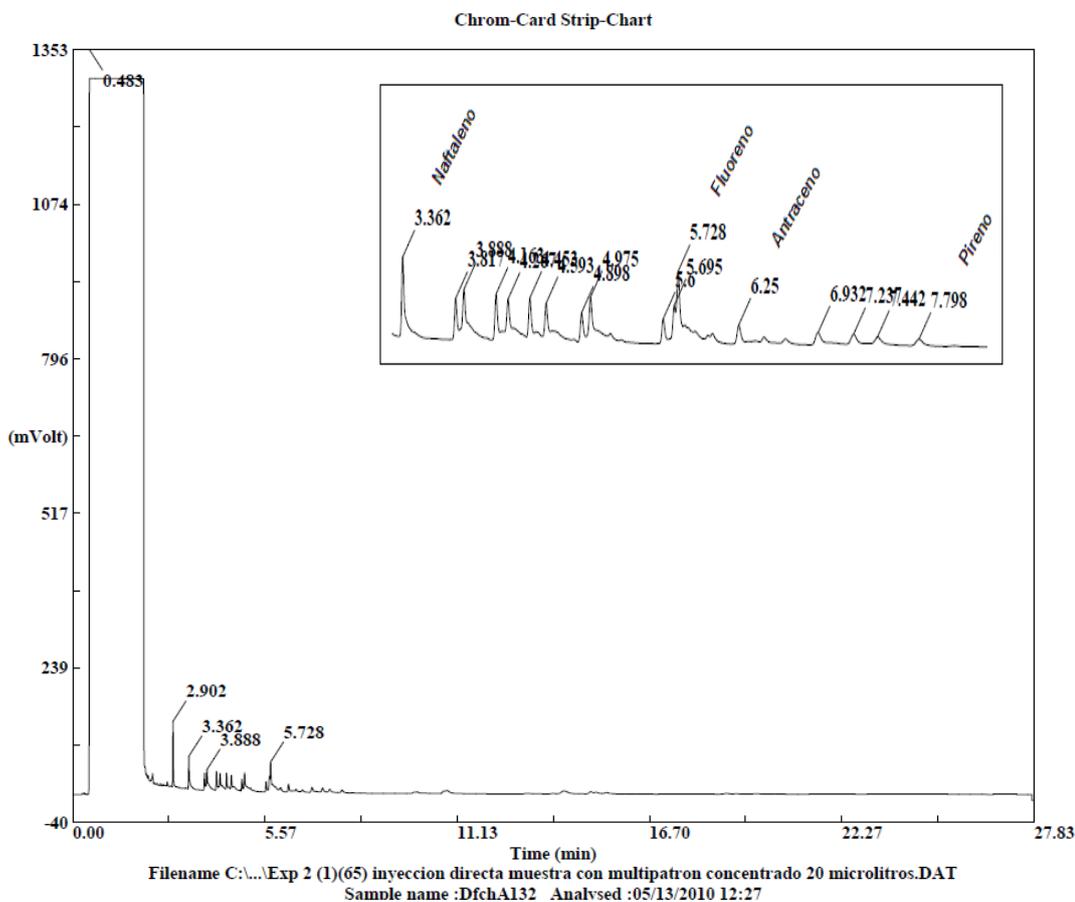


Figura N° 35. Inyección directa al cromatógrafo de gases de 20 μ L de muestra remanente.

Se aprecia que la mezcla de solventes permite extraer los HAPs, ya que en la ampliación logramos observar los picos correspondientes al naftaleno, fluoreno, antraceno y pireno, los cuales no son sorbidos por la fibra en esta técnica empleada, lo que indica que estos compuestos deben encontrarse en una baja concentración y luego de realizada la extracción, estos deben diluirse aun más para que no sean sorbidos por la misma y como se explicó anteriormente la cantidad de moléculas extraídas por la fibra depende de la concentración en que se encuentre los analitos en la muestra ^[16 y 42] por lo que con la intención de verificar este hecho se procedió a homogeneizar 0,2900 g de silica con 20 μ L de una disolución de criseno y esto a su vez contaminado con 0,0100 g de la mezcla de patrones puros (IV) conformada por

los patrones sólidos que se poseen, la composición de ésta última se pudo apreciar en la tabla (n° 24) página (87), esto fue extraído nuevamente con 3 mL de la mezcla acetonitrilo/acetato de etilo, y a continuación se observa el resultado obtenido (ver figura 36).

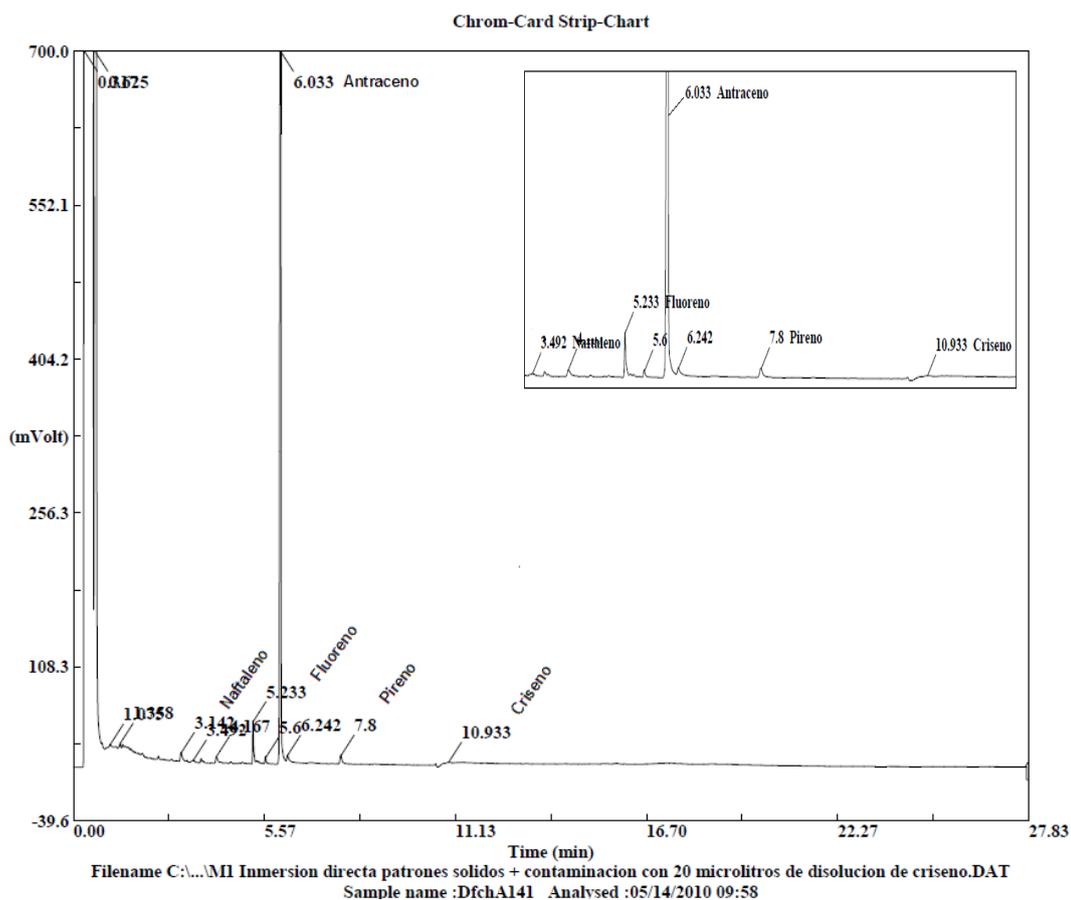


Figura N° 36. Homogeneización de silica + mezcla de patrones puros (IV) + disolución de criseno, obtenido por ID-MEFS-CG con la fibra de 65 μm de PDMS-DVB.

Con este resultado se confirma que la fibra es capaz de sorber los hidrocarburos en cuestión empleando la técnica de ID-MEFS-CG, pero estos deben encontrarse en una concentración tal para ser detectados, por lo que se comprueba además que los HAPs presentes en el multipatrón concentrado de 400 ppm y que se intentaron sorber por medio de la fibra de 65 μm de PDMS-DVB, se deben encontrar

en una concentración inferior la cual debe disminuir aun más, ya que se realiza una dilución al momento de extraer los mismos de dicho patrón.

Por otra parte, no se observa con claridad el pico que debe corresponder al criseno a pesar que se contaminó la silica con una disolución de éste, por lo que para verificar que la extracción con la mezcla de solventes fuese capaz de extraer dicho compuesto se procedió a realizar nuevamente la inyección directa al cromatógrafo de gases de 20 μ L de la solución remanente obteniéndose el siguiente resultado (ver figura 37).

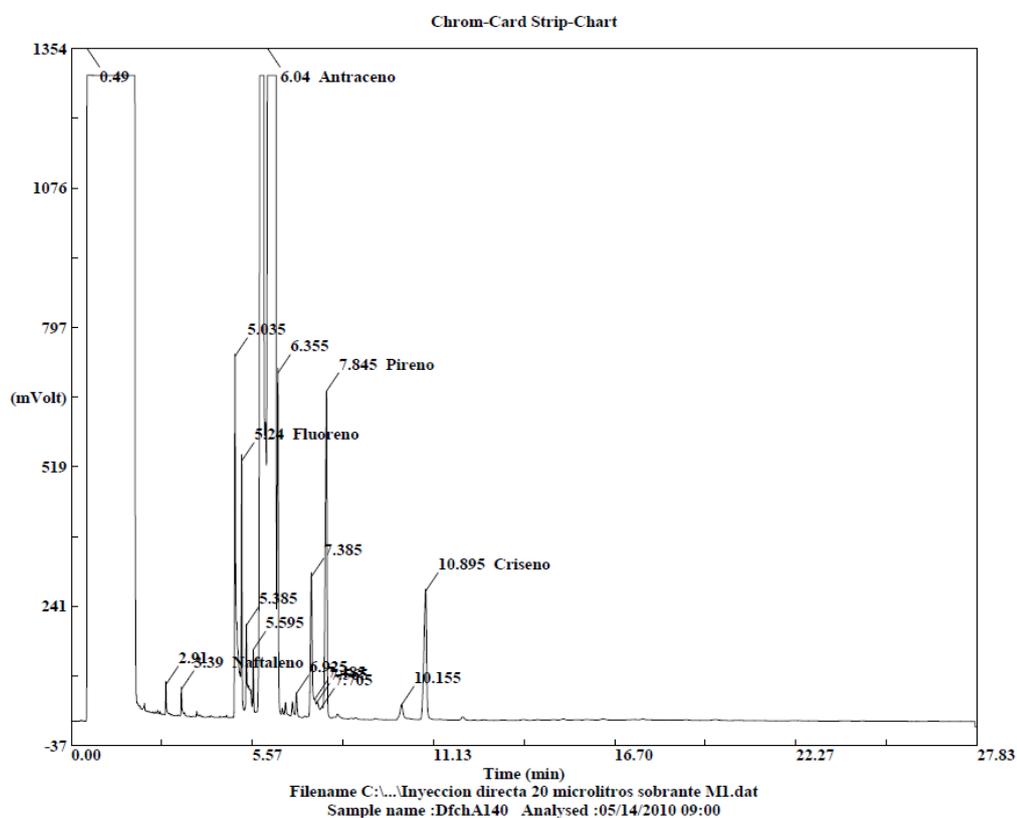


Figura N° 37. Inyección directa al cromatógrafo de gases de 20 μ L de la solución remanente.

Se comprueba por lo tanto que la mezcla acetonitrilo/acetato de etilo permite extraer los HAPs incluido el criseno que antes no aparecía claramente en los cromatogramas, por lo que se consideró que las condiciones empleadas para la ID-

MEFS-CG no son las correctas, ante esto se procedió a realizar la optimización tanto de la temperatura, como del tiempo empleado para la sorción de los HAPs.

6.3.1. 3 Etapa de sorción

Para obtener las condiciones de sorción que deben emplearse para estudiar los HAPs por ID-MEFS-CG, se procedió a optimizar tanto la temperatura del baño de glicerina así como el tiempo de sorción de la fibra. A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada caso.

6.3.1.3.1 Optimización de la temperatura de sorción para el proceso de ID-MEFS-CG.

Para determinar la temperatura óptima de sorción de los HAPs, se realizó una curva de áreas del HAPs Vs temperaturas del baño de glicerina, dejando fijo el tiempo de sorción de los hidrocarburos en 60 min, y variando la temperatura en intervalos de 10 grados desde 35 °C hasta 75 °C. Para este estudio se elaboró la muestra sintética (E) la cual está constituida por la homogeneización de 0,2900 g de silica con 0,0100 g de la mezcla de patrones puros (IV), la cual posee la composición mostrada en (la tabla n° 24 página 87) y ésta a su vez se contaminó con 20 µL de una disolución de criseno, la concentración a la cual se encuentran los patrones empleados en dicha muestra puede apreciarse en la tabla (28), posteriormente pueden observarse los resultados obtenidos de las áreas en función de la temperatura en la tabla (n° 29) y por último la evaluación realizada de cada patrón, en los gráficos de área de HAPs Vs temperatura, (ver figuras n° 38-A, B, C, D y E).

Tabla N° 28. Concentración de los HAPs contenidos en la muestra sintética (E) (producto de homogeneizar 0,0100 g de la mezcla (IV) + 0,2900 g de silica + 20 µL de una disolución de criseno).

Patrón	(Concentración ± S) (µg/g) • 10⁻³
Naftaleno	0,36 ± 0,04
Fluoreno	0,30 ± 0,03
Antraceno	8,9 ± 0,9
Pireno	0,30 ± 0,03
Criseno	0,12 ± 0,02

Tabla N° 29. Resultados de las áreas vs temperatura del baño de glicerina con tiempo de sorción de 60 min.

Experiencia	Temperatura (°C)	HAPs	Área
1	35	Naftaleno	0
		Fluoreno	1.043.571
		Antraceno	23.016.530
		Pireno	0
		Criseno	0
2	45	Naftaleno	0
		Fluoreno	1.003.944
		Antraceno	26.523.340
		Pireno	456.723
		Criseno	0

Experiencia	Temperatura (°C)	HAPs	Área
3	55	Naftaleno	0
		Fluoreno	843.786
		Antraceno	22.706.610
		Pireno	251.920
		Criseno	2.135.009
4	65	Naftaleno	119.280
		Fluoreno	2.065.694
		Antraceno	32.086.320
		Pireno	331.436
		Criseno	203.310
5	75	Naftaleno	0
		Fluoreno	1.089.705
		Antraceno	22.383.630
		Pireno	0
		Criseno	393.199

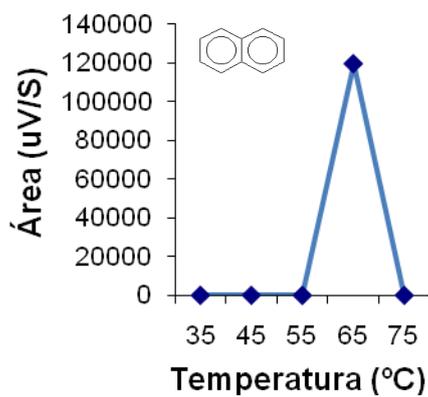


Figura N° 38-A. Área de naftaleno vs Temperatura

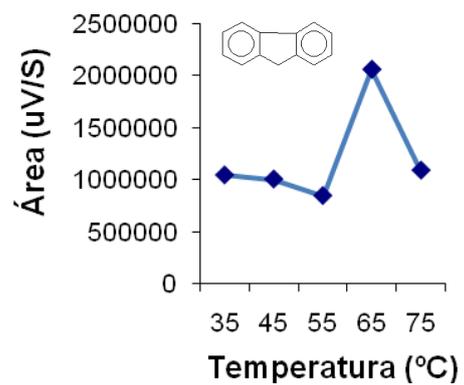


Figura N° 38-B. Área de fluoreno vs Temperatura

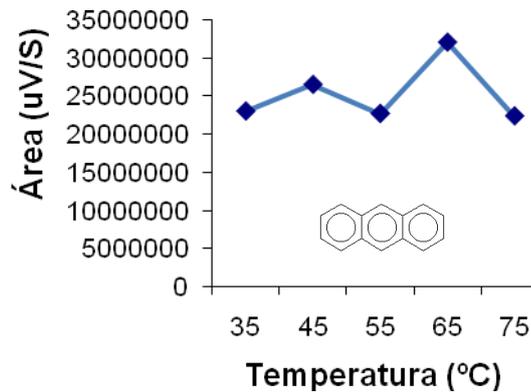


Figura N° 38-C. Área de antraceno vs Temperatura

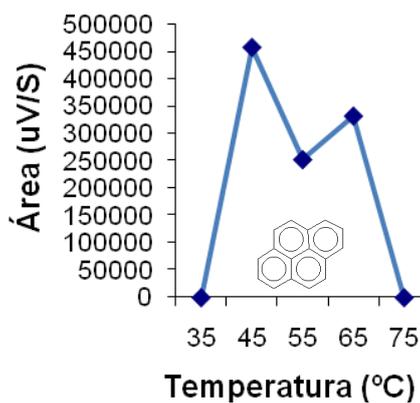


Figura N° 38-D. Área de pireno vs Temperatura

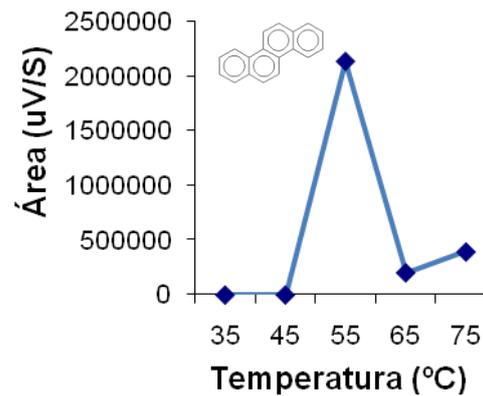


Figura N° 38-E. Área de criseno vs Temperatura

Se logra apreciar que cada HAPs posee una condición específica para que sea sorbido por la fibra y se ve reflejado en que existe un aumento de las áreas para ciertas temperaturas. Es decir no hay una condición general para la sorción de los HAPs presentados en este trabajo, lo que existe es un compromiso para la temperatura a trabajar, ya que, si lo que se busca es maximizar el área del pico como todo proceso de optimización efectivamente la temperatura óptima de trabajo es 65 °C, ya que en esta se ven favorecidos el naftaleno, fluoreno y antraceno y únicamente perjudicados el pireno y criseno, sin embargo si el objetivo del trabajo fuese determinar los HAPs individualmente cada hidrocarburo presenta una

condición particular para ser sorbida por la fibra, debido a que la temperatura de extracción en el proceso de MEFS contribuye de dos formas totalmente opuestas, al aumentar la temperatura aumenta la concentración de los analitos, por lo que la extracción es rápida. Por otro lado, un aumento de la temperatura disminuye los coeficientes de distribución del analito entre la muestra y la fibra por lo que la eficacia de la extracción se ve afectada negativamente.^[19] Por todo lo anteriormente explicado podemos concluir que la temperatura óptima para la sorción de los hidrocarburos en estudio es 65 °C.

Los cromatogramas obtenidos correspondientes a las experiencias realizadas pueden observarse en el (Apéndice n° 3) (figuras A.3-1, 2, 3, 4, 5).

Para realizar la optimización del tiempo de sorción se elaboró previamente la mezcla de patrones puros (V) en la cual se duplicó la cantidad de naftaleno que se venía empleando con la intención de apreciar este pico claramente ya que se realiza una extracción con solventes y esto diluye aun más la mezcla preparada, la composición de dicha mezcla se puede ver en la tabla (n° 30).

Tabla N° 30. Proporciones de los patrones puros empleados para elaborar la mezcla (V)

Patrón de HAPs	(Masa \pm 0,0001) g	% P/P \pm 0,02	(Concentración \pm S) ($\mu\text{g/g}$) $\cdot 10^{-3}$
Naftaleno	0,0608	7,05	71 \pm 7
Fluoreno	0,0253	2,94	29 \pm 3
Antraceno	0,7504	87,05	871 \pm 87
Pireno	0,0255	2,96	30 \pm 3

Para el estudio en cuestión de la optimización del tiempo de sorción, se elaboró la muestra sintética (F), la cual está constituida por la homogeneización de 0,0100 g de la mezcla (V) con 0,2900 g de silica. La concentración a la cual se encuentran los patrones que conforman la misma se puede apreciar en la tabla n° 31.

Tabla N° 31. Concentración de los HAPs contenidos en la muestra sintética (F) (producto de homogeneizar 0,0100 g de la mezcla (V) con 0,2900 g de silica).

Patrón	(Concentración \pm S) ($\mu\text{g/g}$) \cdot 10-3
Naftaleno	0,70 \pm 0,07
Fluoreno	0,29 \pm 0,03
Antraceno	8,71 \pm 0,88
Pireno	0,30 \pm 0,03

6.3.1.3.2 Optimización del tiempo de sorción para el proceso de ID-MEFS-CG.

Para obtener el tiempo óptimo de sorción de los hidrocarburos se realizó una curva de área del HAPs Vs tiempo de sorción dejando fija la temperatura óptima de sorción de 65 °C, variando el tiempo en intervalos de 10 min desde 40 min hasta 70 min y para ello se utilizó la muestra sintética (F) que es el producto de homogeneizar de 0,2900 g de silica con 0,0100 g de la mezcla de patrones (V) la cual posee la composición presentada en (la tabla n° 30 página 103) y esto a su vez contaminados con 20 μL de la disolución de criseno, los resultados obtenidos para las áreas se pueden apreciar en la tabla (n° 32) y posteriormente se podrá observar la evaluación de cada patrón individualmente, expuesta en los gráficos de área de HAPs Vs tiempo de sorción (ver figuras n° 39-A, B, C y D).

Tabla N° 32. Resultados de las áreas vs tiempo de sorción, para 65 °C del baño de glicerina

Experiencia	Tiempo (min)	HAPs	Área
1	40	Naftaleno	4.770.226
		Fluoreno	1.059.048
		Antraceno	13.689.950
		Pireno	269.355
		Criseno	-----
2	50	Naftaleno	3.201.759
		Fluoreno	701.951
		Antraceno	13.544.440
		Pireno	180.779
		Criseno	-----
3	60	Naftaleno	1.815.400
		Fluoreno	477.197
		Antraceno	11.210.780
		Pireno	191.125
		Criseno	-----
4	70	Naftaleno	5.554.058
		Fluoreno	16.807.490
		Antraceno	16.807.490
		Pireno	626.754
		Criseno	-----

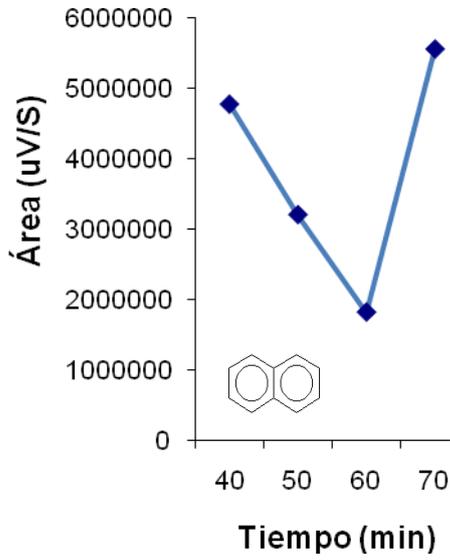


Figura N° 39-A. Área de naftaleno vs Tiempo

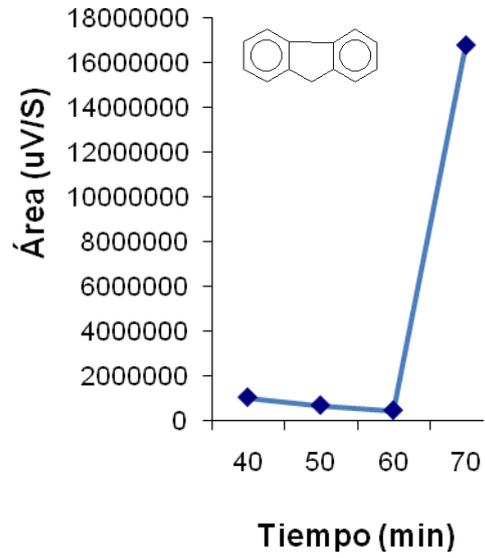


Figura N° 39-B Área de fluoreno vs Tiempo

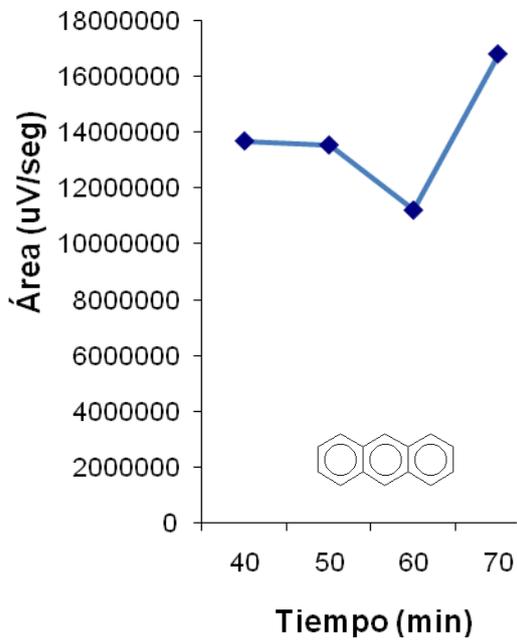


Figura N° 39-C. Área de antraceno vs Tiempo

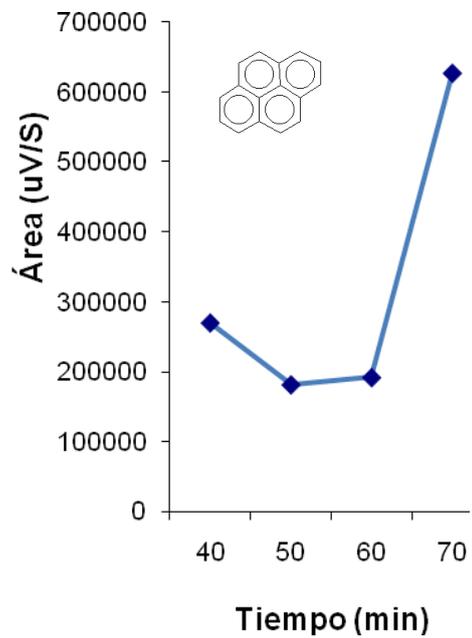


Figura N° 39-D. Área de pireno vs Tiempo

Se aprecia gráficamente que los 4 hidrocarburos detectados presentan la misma tendencia, el cual es que el área disminuya a medida que avanza el tiempo lo cual se observa en el rango de (40-60) min. Los valores máximos se alcanzan a los 40 y 70 min, éste último no se puede asegurar sea un máximo absoluto debido a que no se realizaron pruebas a tiempos superiores. Asimismo cabe mencionar que cada HAPs presenta un rango de tiempo característico en donde el área obtenida puede alcanzar un equilibrio y pequeñas oscilaciones del mismo pueden variar de forma considerable la cantidad de analito extraído, Por lo antes expuesto la condición óptima que se debiese emplear es 70 min como tiempo de sorción de los HAPs, ya que a éste, el área de los hidrocarburos aumenta significativamente, pero dado que se altera la línea base del cromatograma y puede ser apreciado en el apéndice 4 (figura A.4-4), se decidió emplear el tiempo de 40 min como condición óptima, debido a que a éste de igual forma se observa el aumento de las áreas de los compuestos presentes, sin alterar la misma.

Los cromatogramas obtenidos correspondientes a las experiencias realizadas de optimización del tiempo de sorción de la fibra, se pueden apreciar en el apéndice n° 4 (figuras A.4-1, 2, 3, 4).

6.3.1.4 Etapa de desorción.

Para esta sección se continuó empleando la condiciones obtenidas para la técnica de EC-MEFS-CG, ya que esta nos permite detectar los HAPs sin producir daño a la fase estacionaria de la columna, lo cual si fue visto al aplicar las condiciones obtenidas por Moreira Vaz ^[40], en el que se presencié el sangrado de la columna, por lo que fueron descartadas aplicar las mismas.

Dicho todo esto se puede decir que las condiciones óptimas que deben emplearse para el proceso de ID-MEFS-CG son las siguientes (ver tabla n° 7 página (57) y tabla n° 33).

Tabla N° 33. Solvente y volumen de extracción, condiciones de sorción y desorción para ID-MEFS-CG

Solvente		Volumen (mL)	
Mezcla acetonitrilo/acetato de etilo		3	
	Tiempo (min)	Temperatura de (°C)	
Sorción	40	65	
	Tiempo (min)	Temperatura del puerto de inyección (°C)	Temperatura del detector (°C)
Desorción	10	260	300

6.4 Comparación entre EC-MEFS-CG e ID-MEFS-CG

A continuación se muestra la tabla (n° 34) en la cual se realiza una comparación de ambas técnicas empleadas, esto es realizado con la intención de observar así lo positivo y negativo de cada técnica descrita.

Tabla N° 34. Cuadro comparativo entre EC-MEFS-CG e ID-MEFS-CG.

	EC-MEFS-CG	ID-MEFS-CG
Cantidad de muestra empleada (g)	1,0000	0,3000
Volumen de extracción (mL)	N.A	3
Tiempo de agitación en ultrasonido (min)	N.A	20
Tiempo de centrifugación (min)	N.A	4
Temperatura del baño de glicerina (°C)	93	65
Tiempo de sorción de los HAPs (min)	60	40
Fibra empleada	65 µm PDMS-DVB	65 µm PDMS-DVB
Desorción de los HAPs	Idéntica	Idéntica
Tratamiento de muestra	Sencillo	Más riguroso
Tiempo de vida de la fibra de microextracción	Indicada por el fabricante de la misma	Aproximadamente de 40 a 50 inyecciones de la muestra
Tiempo en alcanzar el equilibrio de extracción	+	-
Número de HAPs detectados	4	4*

Como se observa el método EC-MEFS-CG, no se realizan una serie de pasos que si se emplean por ID-MEFS-CG, es a esto a los que nos referimos en que la primera posee un tratamiento de muestra sencillo respecto a la otra. La ventaja que posee la inmersión directa, es que se puede utilizar una cantidad menor de muestra y la diferencia presentada en la cantidad tomada para ambos métodos tiene que ver con el tamaño del vial empleado, es decir para EC-MEFS-CG se empleó un vial de 10 mL en el cual podemos colocar plenamente 1,0000 g de muestra y realizar el proceso de sorción correspondiente, en cambio para ID-MEFS-CG, no se utilizó este vial en cuestión ya que esto hubiese ameritado emplear una cantidad mayor de solvente para extraer los analitos y así garantizar introducir completamente la fibra en la muestra sin que esta sufriera algún daño, es por esto que se empleó para este método un vial de 5 mL donde se garantizó que la fibra estuviera expuesta directamente en la solución. En cuanto a los compuestos detectados ambos métodos detectaron 4 HAPs, pero nos resulto más confiable el método de EC-MEFS-CG, ya que el de ID-MEFS-CG, dependía mucho del tratamiento de la muestra o la cantidad tomada de la misma por lo que en ocasiones podían detectarse un número menor de hidrocarburos.

En cuanto a la vida útil inferior de la fibra para el caso de ID-MEFS respecto a EC-MEFS, es debido a que la primera se expone directamente a la matriz de la muestra a tratar, y esto se descarta en el caso de espacio confinado.

6.5 Análisis de las muestras.

Seguidamente se procedió a identificar los HAPs en las muestras de cereales y poder así verificar la metodología desarrollada para determinar los mismos por ambas técnicas de microextracción en fase sólida empleando la fibra de 65 μm de PDMS-DVB.

Se emplearon muestras de trigo (TSRW), trigo (HRW), maíz amarillo y maíz blanco, cabe destacar que las muestras de maíz se presumen estén contaminadas

con naftaleno ya que el ambiente donde se encontraban estas, se podía sentir el olor característico del mismo, por lo que esto fue corroborado, realizadas las experiencias que se muestran más adelante con los cromatogramas obtenidos tanto para EC-MEFS-CG como para ID-MEFS-CG.

Para el análisis de cada muestra se realizaron dos experimentos. El primero fue colocar 1,0000 g de la muestra en el vial de 10 mL y aplicar los procesos de sorción y desorción óptimos para el método de EC-MEFS-CG; el segundo fue colocar 0,3000 g de la muestra en el vial de 5 mL y aplicar la condiciones de extracción, sorción y desorción óptimos para el método de ID-MEFS-CG. Seguidamente se compararon las áreas obtenidas para los HAPs identificados por ambos métodos, y por último se graficaron estas versus los patrones de los hidrocarburos respectivos.

6.5.1 Análisis de las muestras de trigo.

6.5.1.1 Muestra de trigo (TSRW), analizada por EC-MEFS-CG.

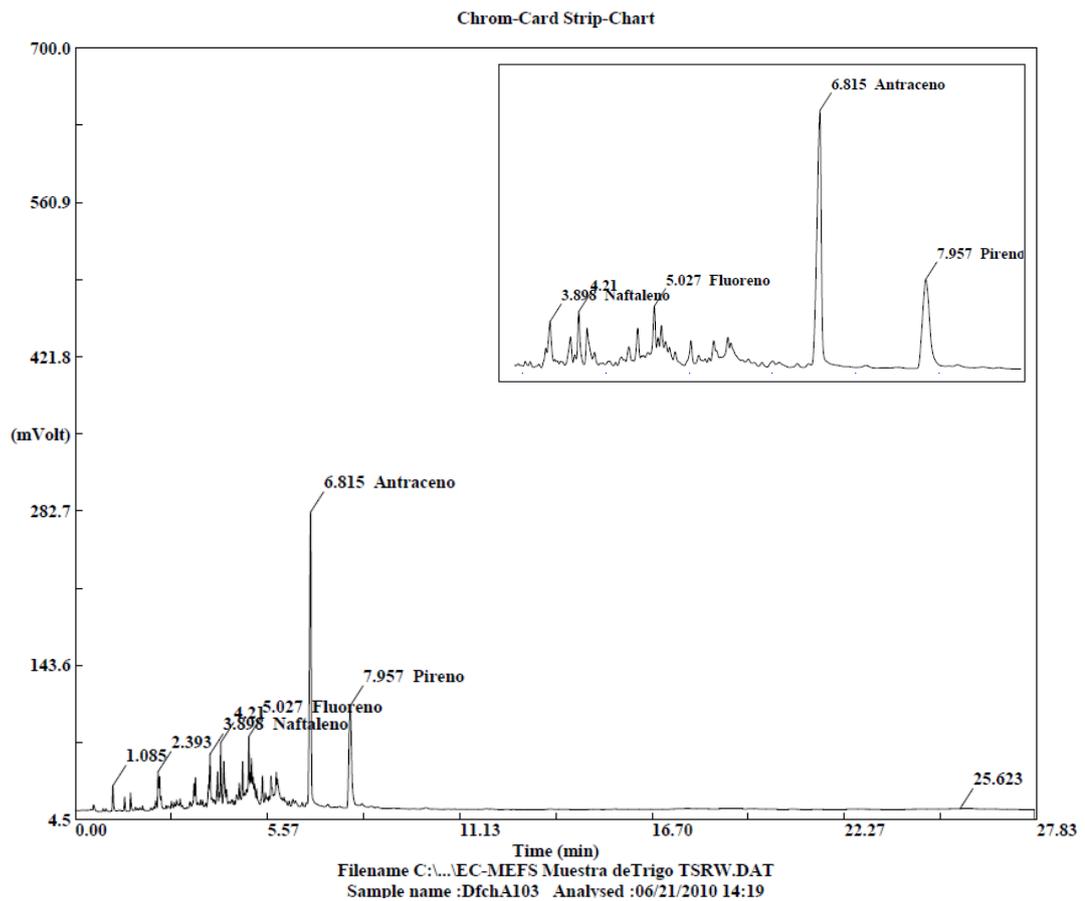


Figura N° 40. EC-MEFS-CG / muestra de trigo TSRW

Se aprecia la presencia de los picos correspondientes a los HAPs estudiados así como de otros componentes, por lo que el método empleado permite con facilidad y sin un riguroso tratamiento de la muestra determinar dichos compuestos.

6.5.1.2 Muestra de trigo (TSRW), analizada por ID-MEFS-CG.

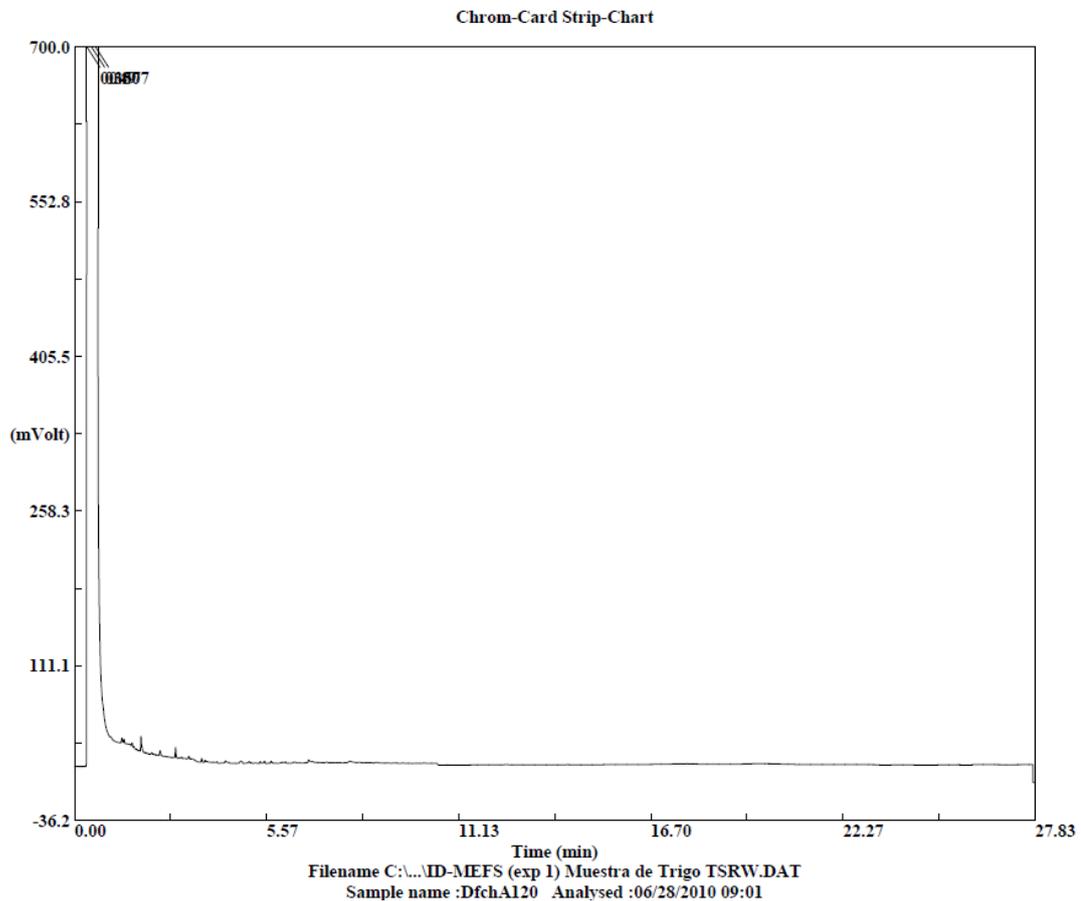


Figura N° 41. ID-MEFS-CG / muestra de trigo TSRW

A diferencia de la muestra que fue analizada por EC-MEFS-CG, no se logra apreciar la presencia de los HAPs únicamente se observa el pico correspondiente al solvente, esto se debe a que la fibra no logró sorber los compuestos y esto puede corresponder a que los mismos se pueden encontrar en una baja concentración y por ello no fueron detectados, a continuación se muestra los resultados obtenidos para las áreas de cada HAPs (ver tabla n° 35).

Tabla N° 35. Comparación de áreas EC-MEFS-CG / ID-MEFS-CG muestra de trigo TSRW

	Área EC-MEFS-CG	Área ID-MEFS-CG
Naftaleno	3.272.420	0
Fluoreno	14.520.080	0
Antraceno	20.598.140	0
Pireno	4.901.045	0
Criseno	-----	-----

Como se puede observar sólo se obtienen resultados para la muestra analizada por EC-MEFS-CG, lo que nos indica que dicha técnica resulta ser más eficiente para la obtención de los picos correspondientes a los HAPs en estudio en la muestra de trigo (TSRW) y esto puede observarse de igual forma en el siguiente gráfico de áreas vs HAPs (ver figura 42).

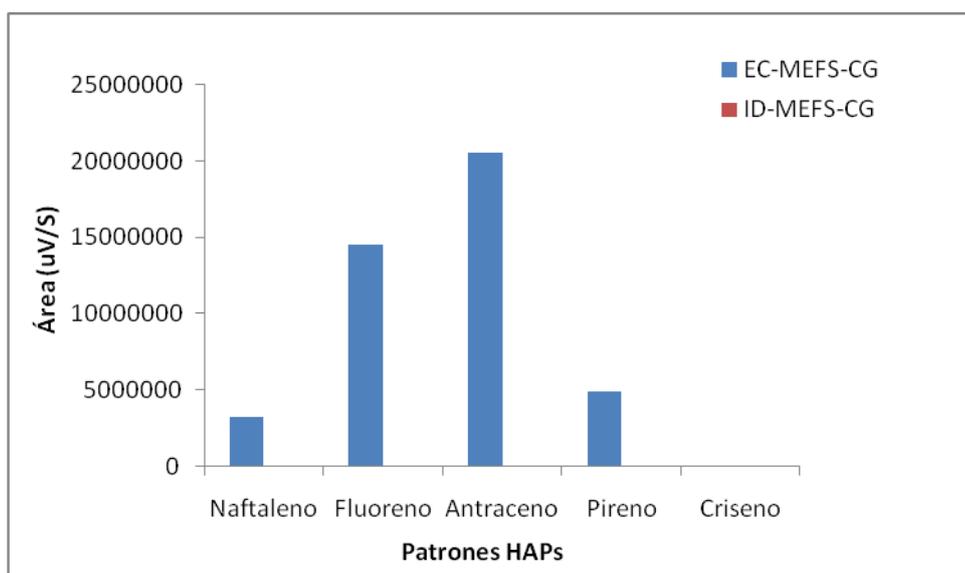


Figura N° 42. Comparación áreas EC-MEFS-CG / ID-MEFS-CG muestra de trigo TSRW

De lo anteriormente visto y explicado se puede decir que los HAPs en estudio se pueden detectar en la muestra de trigo (TSRW) empleando el método de EC-MEFS-CG.

6.5.1.3 Muestra de trigo (HRW), analizada por EC-MEFS-CG.

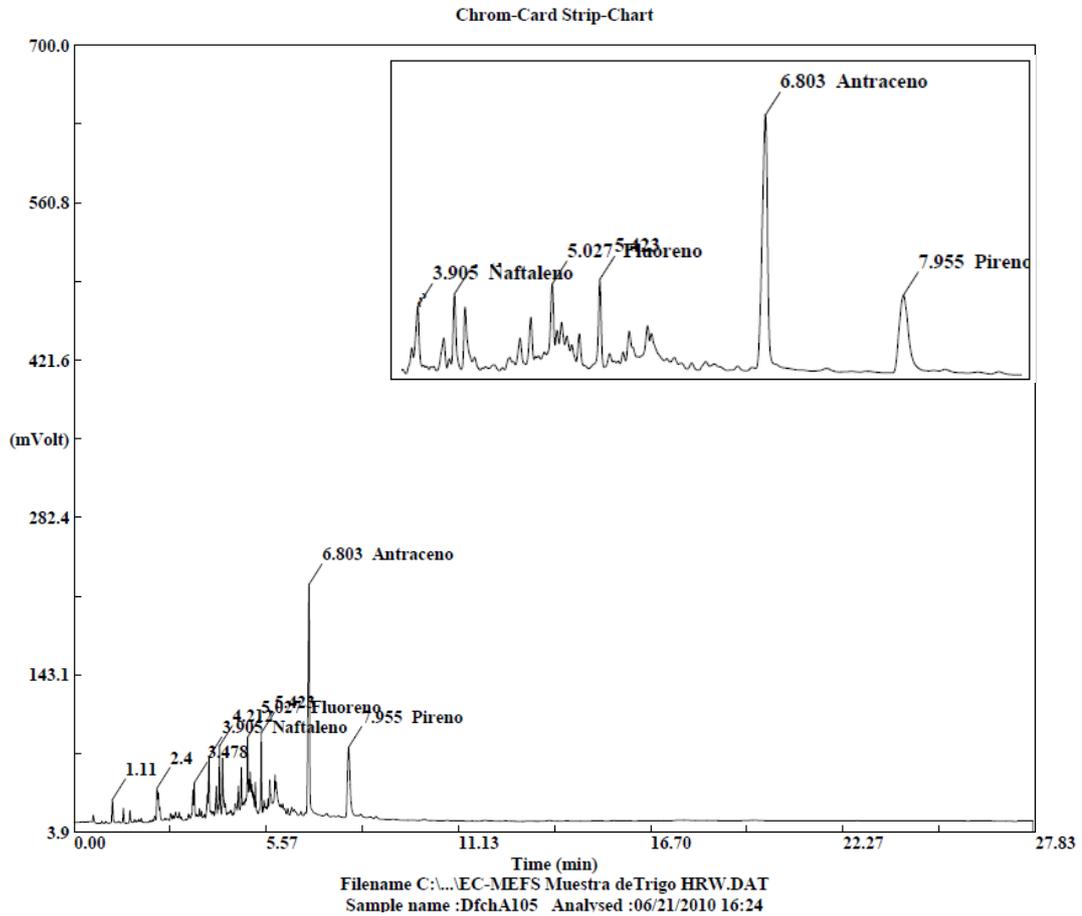


Figura N° 43. EC-MEFS-CG / muestra de trigo HRW

Se observa que el proceso de EC-MEFS-CG permite claramente determinar los HAPs considerados volátiles en dicha muestra y de otros componentes que puedan estar en la misma.

6.5.1.4 Muestra de trigo (HRW), analizada por ID-MEFS-CG.

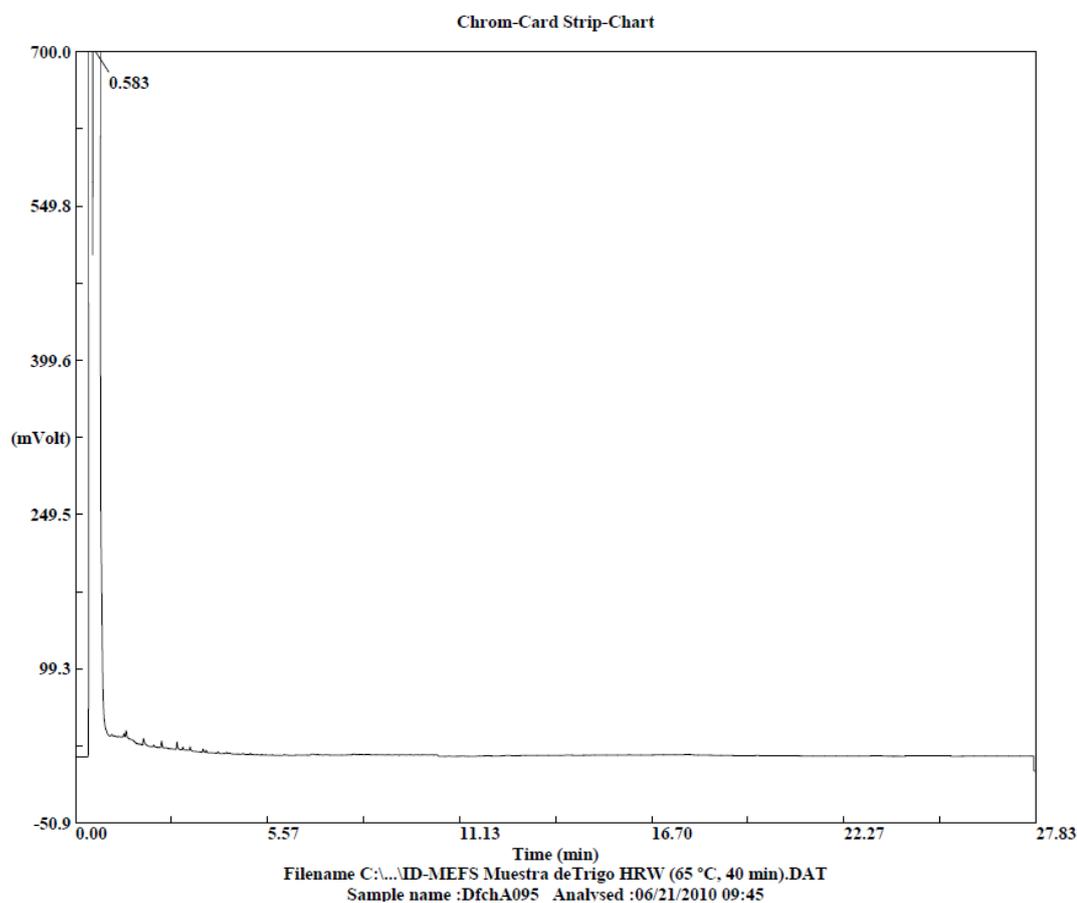


Figura N° 44. ID-MEFS-CG / muestra de trigo HRW

De igual forma se aprecia que para la determinación de los HAPs empleando el método de ID-MEFS-CG, no se logran observar los picos correspondientes a estos compuestos y es debido de igual manera a que los mismos deben encontrarse en una cantidad muy baja que no pueden ser detectados, y es por ello que se presentan los resultados obtenidos para la áreas de los HAPs en estudio ver tabla (n° 36).

Tabla N° 36. Comparación de áreas EC-MEFS-CG / ID-MEFS-CG muestra de trigo HRW.

	Área EC-MEFS-CG	Área ID-MEFS-CG
Naftaleno	3.536.687	0
Fluoreno	6.426.996	0
Antraceno	131.920.200	0
Pireno	3.314.721	0
Criseno	-----	-----

Los resultados obtenidos nos indican nuevamente que la muestra analizada por EC-MEFS-CG, resulto ser más eficiente para la obtención de los picos correspondientes a los HAPs en estudio en la muestra de trigo (HRW) y esto se puede apreciar en el siguiente gráfico de áreas vs HAPs (ver figura 45).

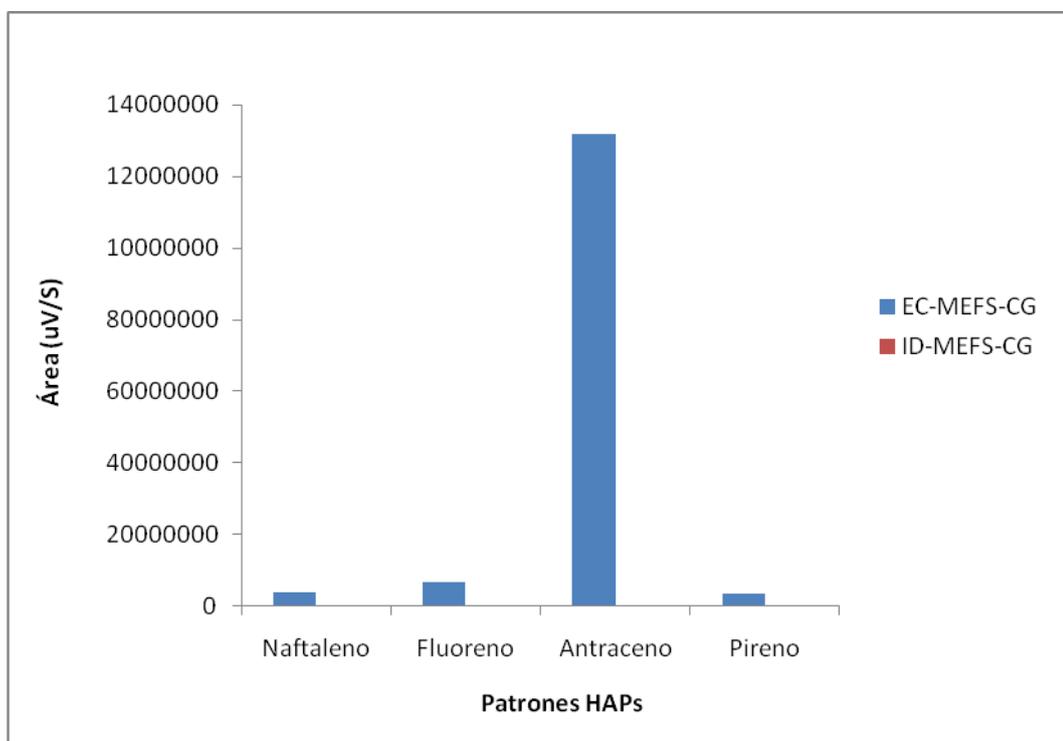


Figura N° 45. Comparación áreas EC-MEFS-CG / ID-MEFS-CG muestra de trigo HRW.

Se comprueba por lo tanto que no son detectados los HAPs en estudio por el método de ID-MEFS-CG, visto y explicado esto se puede decir que los mismos, se pueden detectar en la muestra de trigo (HRW) empleando el método de EC-MEFS-CG.

Para observar si este comportamiento se mantiene en todas la muestras de cereales, se procedió a aplicar los mismos estudios en muestras de maíz y determinar si en estas, la presencia de HAPs sigue el mismo patrón o existe alguna diferencia y así proceder a reportarlo ya que en la bibliografía consultada no hay reporte alguno para esta cereal en particular, también aunado a que es considerado uno de los cereales de mayor importancia en nuestro país. Además de sus usos en la agroindustria, la alimentación humana y animal, constituye un recurso fundamental para la nutrición de la población, por lo que es considerado como el ícono de la alimentación en Venezuela.

El maíz resulta fundamental en la mesa de las familias venezolanas. Se consume como desayuno, almuerzo o cena y representa prácticamente el 50% de la energía que utilizamos para realizar nuestras actividades diarias, motivado a esto es que se decidió implementarlo como una de nuestras muestras a estudiar en el presente trabajo y a continuación se muestran los resultados obtenidos.

6.5.2 Análisis de las muestras de maíz

6.5.2.1 Muestra de maíz amarillo, analizada por EC-MEFS-CG.

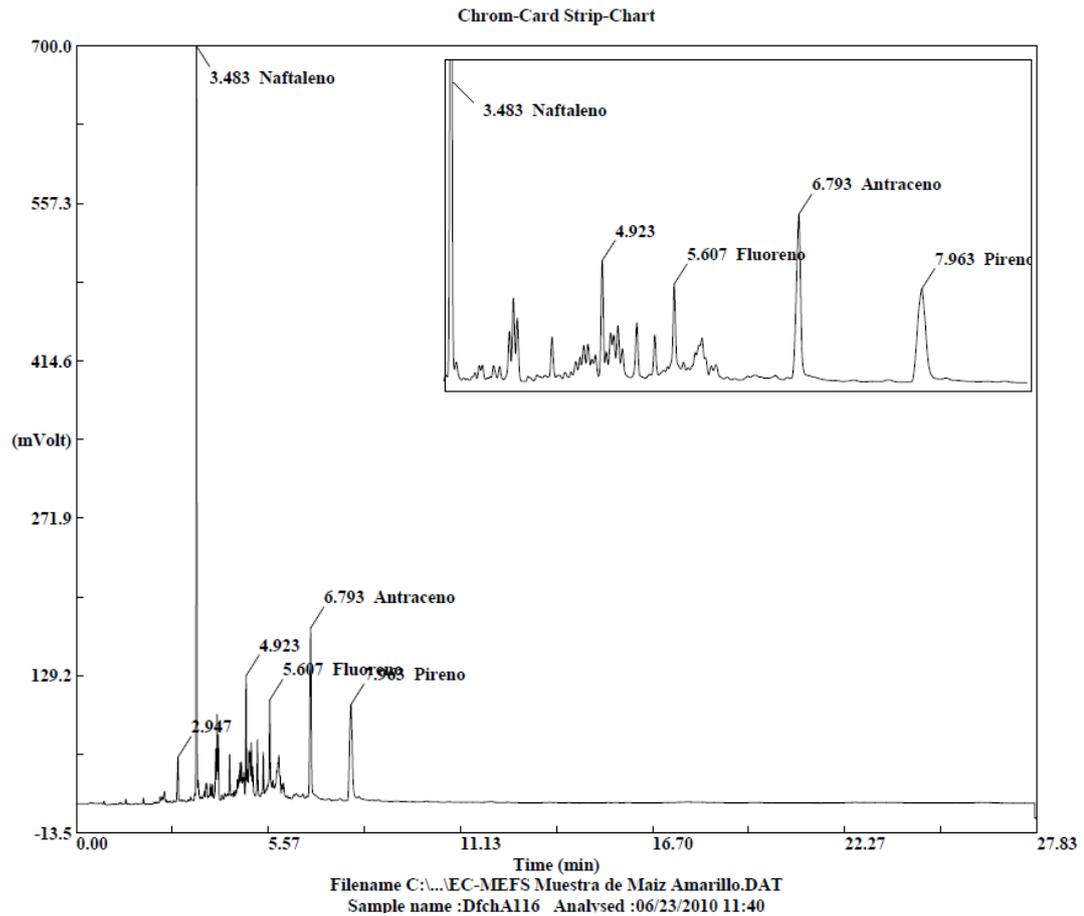


Figura N° 46. EC-MEFS-CG / muestra de maíz amarillo

Se aprecia la presencia de los picos correspondientes a los HAPs estudiados así como de otros componentes y como se puede corroborar la muestra de maíz amarillo se encuentra contaminada con naftaleno ya que el pico correspondiente a este compuesto, se observa en mayor tamaño respecto a los otros, pero de igual forma podemos decir que la técnica empleada permite detectar claramente la presencia de los otros HAPs considerados volátiles.

6.5.2.2 Muestra de maíz amarillo, analizada por ID-MEFS-CG.

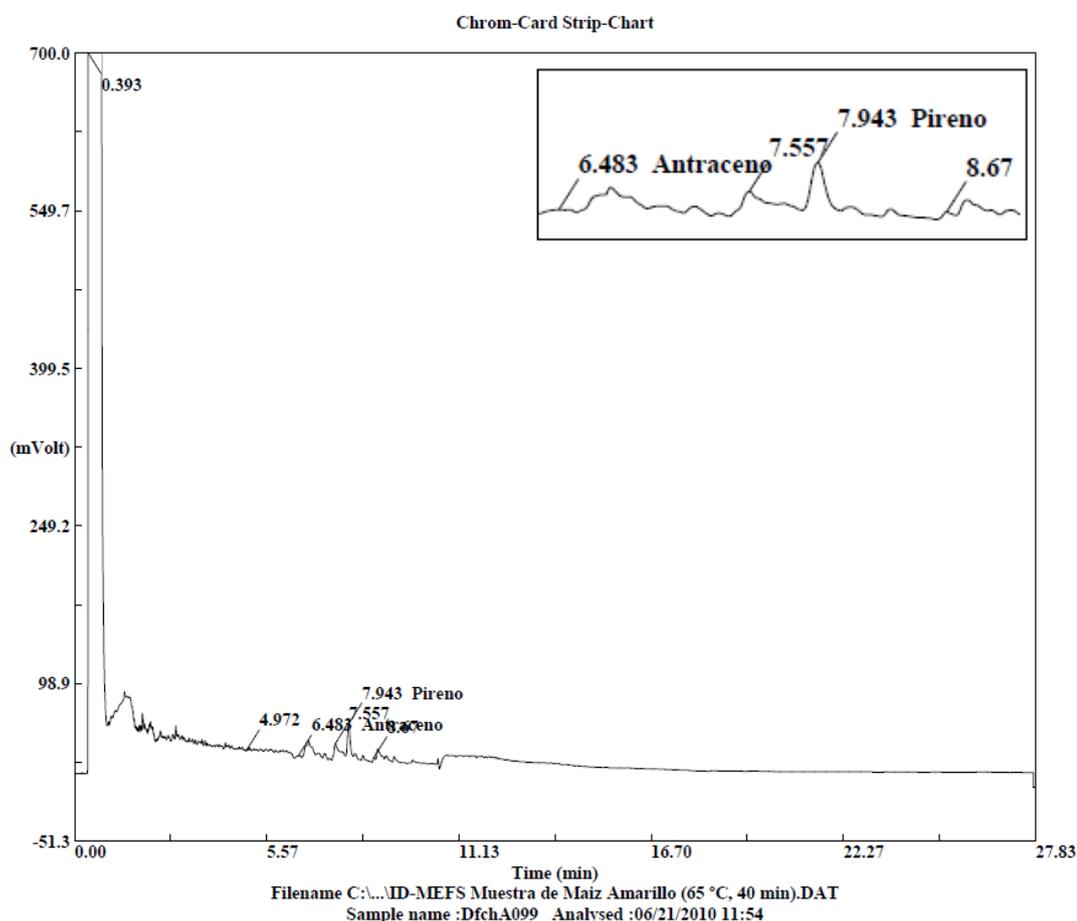


Figura N° 47. ID-MEFS-CG/Muestra de maíz amarillo.

Se logró apreciar la presencia de señal correspondiente a los HAPs en estudio, algo que para esta técnica no fue observado en las muestras de trigo, por lo que estos compuestos deben encontrarse en una mayor cantidad tal que pueden ser detectadas, además esto nos confirma que las condiciones optimizadas son correctas sólo que los compuestos en cuestión es decir los HAPs deben encontrarse en la cantidad adecuada para poder ser sorbidos por la fibra y así poder arrojar señal, además confirma lo indicado previamente en que la cantidad de moléculas extraídas por la fibra es proporcional a su concentración en la muestra.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para las áreas obtenidas ver tabla (n° 37).

Tabla N° 37. Comparación de áreas EC-MEFS-CG / ID-MEFS-CG muestra de maíz amarillo

	Área EC-MEFS-CG	Área ID-MEFS-CG
Naftaleno	159.921.100	0
Fluoreno	1.347.382	0
Antraceno	4.638.808	3.472.489
Pireno	4.551.396	1.627.268
Criseno	-----	-----

Se aprecia que se obtienen los mejores resultados para el método de EC-MEFS-CG, ya que el mismo permite identificar mas componentes, de igual forma se puede observar esto en el siguiente gráfico (ver figura 48), se debe acotar que se redujo la escala correspondiente al área con la intención de lograr apreciar la diferencia existente para ambos métodos.

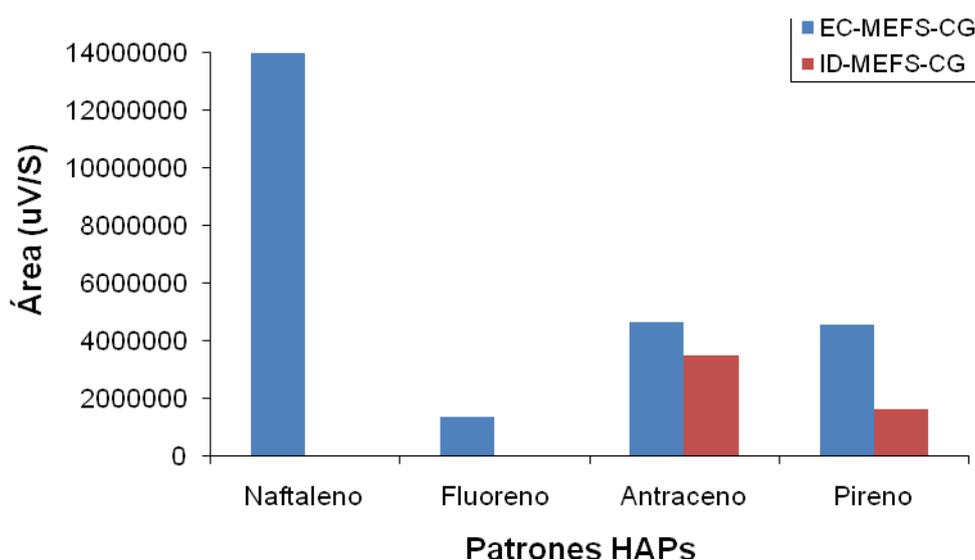


Figura N° 48. Comparación áreas EC-MEFS-CG / ID-MEFS-CG muestra de maíz amarillo

De lo anteriormente visto y explicado se puede decir que los HAPs en estudio se pueden detectar en la muestra de maíz amarillo empleando el método de EC-MEFS-CG.

6.5.2.3 Muestra de maíz blanco, analizada por EC-MEFS-CG.

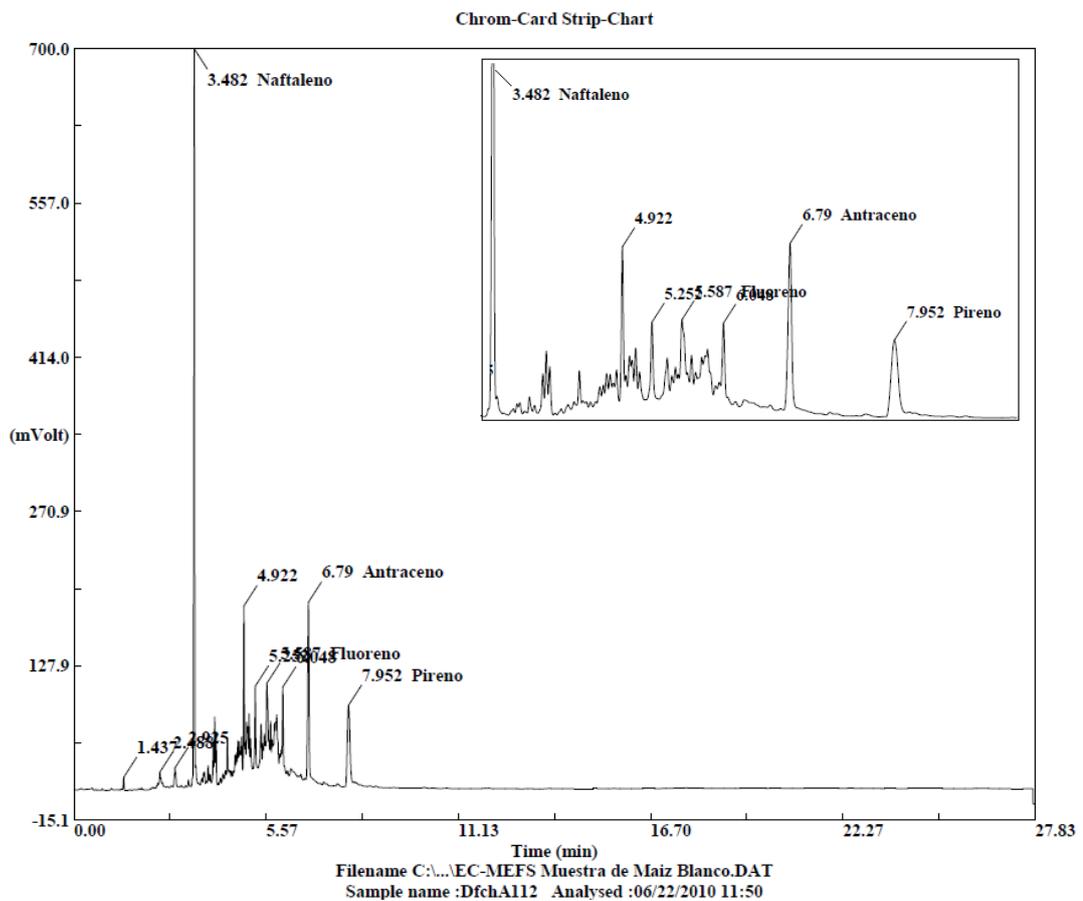


Figura N° 49. EC-MEFS-CG / muestra de maíz blanco

Al igual que ocurrió para la muestra de maíz amarillo, se observa la presencia de los picos correspondientes a los HAPs estudiados, así como de otros componentes y como se puede corroborar la muestra de maíz blanco de igual forma se encuentra contaminada por naftaleno ya que el pico correspondiente a este

compuesto se observa en mayor tamaño respecto a los otros, asimismo podemos decir que la técnica empleada permite eficazmente determinar los HAPs considerados volátiles.

6.5.2.4 Muestra de maíz blanco, analizada por ID-MEFS-CG.

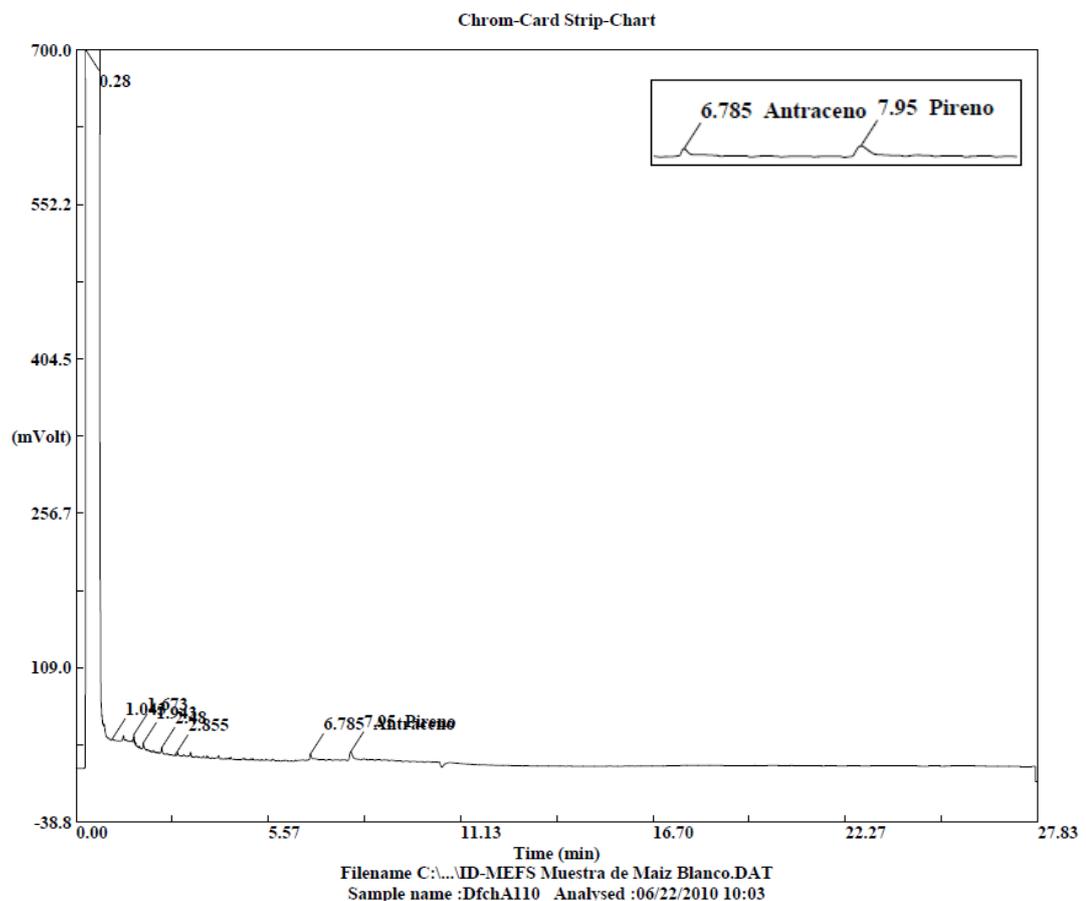


Figura N° 50. ID-MEFS-CG / muestra de maíz blanco

De igual forma que para el caso de las muestras de maíz amarillo, se aprecia la presencia de señal correspondiente a los HAPs en estudio pero a diferencia con la técnica de EC-MEFS-CG la señal es baja y esto se debe a que la cantidad de moléculas extraídas por la fibra depende de la concentración de la muestra.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para las áreas ver tabla (n° 38).

Tabla N° 38. Comparación de áreas EC-MEFS-CG / ID-MEFS-CG muestra de maíz blanco

	Área EC-MEFS-CG	Área ID-MEFS-CG
Naftaleno	187.091.300	0
Fluoreno	1.430.343	0
Antraceno	4.530.512	144.076
Pireno	3.899.421	508.226
Criseno	-----	-----

Se aprecia que se obtienen los mejores resultados para el método de EC-MEFS-CG, ya que la misma permite determinar una mayor cantidad de componentes, de igual forma se puede observar esto en el siguiente gráfico (ver figura 51), nuevamente se redujo la escala correspondiente al área con la intención de lograr apreciar la diferencia existente para ambas técnicas, tal como se realizó para el caso de la muestra de maíz amarillo.

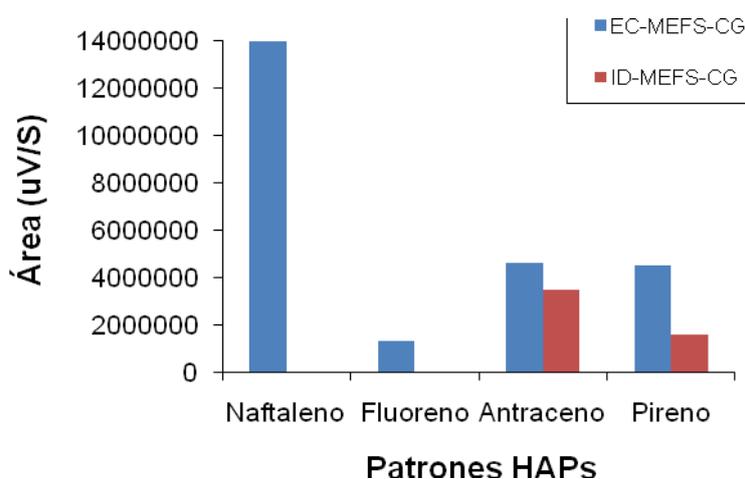


Figura N° 51. Comparación de áreas EC-MEFS-CG / ID-MEFS-CG muestra de maíz blanco

De lo anteriormente visto y explicado se puede decir que los HAPs en estudio se pueden detectar en la muestra de maíz blanco empleando el método de EC-MEFS-CG.

6.6 Repetitividad del método empleado.

Para realizar la determinación de la repetitividad de la técnica optimizada se realizó una experiencia en cuatro (4) oportunidades, empleando la muestra de maíz blanco, debido a que de esta se poseía en mayor cantidad para los análisis y brindó valores altos de señal; se utilizó el método de EC-MEFS del cual se obtuvo como condición de sorción 93 °C de temperatura del baño de glicerina y 60 min de exposición de la fibra, para la desorción se empleó 260 °C de temperatura del puerto de inyección y 10 min para la desorción de los hidrocarburos. Se calculó la desviación estándar relativa tanto para las áreas y el tiempo de retención (t_R) de los picos identificados en la muestra, y se obtiene un rango de (25,57 – 150,53) % para las áreas obtenidas y un rango de (0- 0,07) % para el tiempo de retención; estos valores obtenidos para la áreas nos indican que el método es poco reproducible bien sea por una mala homogeneización de la muestra durante la extracción o por no trabajar en la zona de equilibrio. Los resultados obtenidos para los HAPs identificados se muestran a continuación en las tablas (n° 39, 40 y 41).

Tabla N° 39. Repetitividad de la técnica para el naftaleno

Experiencia	t_R (min)	Áreas
1	3,48	62.618.200
2	3,48	123.590.800
3	3,48	6.703.641
4	3,48	10.490.450
Promedio	3,48	50850772,75
Desviación Estándar	0	54795099,55
%RSD	0	107,76

Tabla N° 40. Repetitividad de la técnica para el antraceno

Experiencia	t_R (min)	Áreas
1	6,78	2.347.628
2	6,78	1.458.612
3	6,78	23.983.410
4	6,77	113.702.500
Promedio	6,78	35373037,50
Desviación Estándar	0,01	53248143,13
%RSD	0,07	150,53

Tabla N° 41. Repetitividad de la técnica para el pireno

Experiencia	t_R (min)	Áreas
1	7,95	2.345.015
2	7,95	1.804.194
3	7,94	1.540.442
4	7,94	1.304.222
Promedio	7,95	1748468,25
Desviación Estándar	0,006	447065,63
%RSD	0,073	25,57

Para lograr observar los resultados se presenta a continuación una serie de gráficos de las áreas de cada HAPs vs la experiencia en que se realizó cada una, (ver figuras 52-A, B y C).

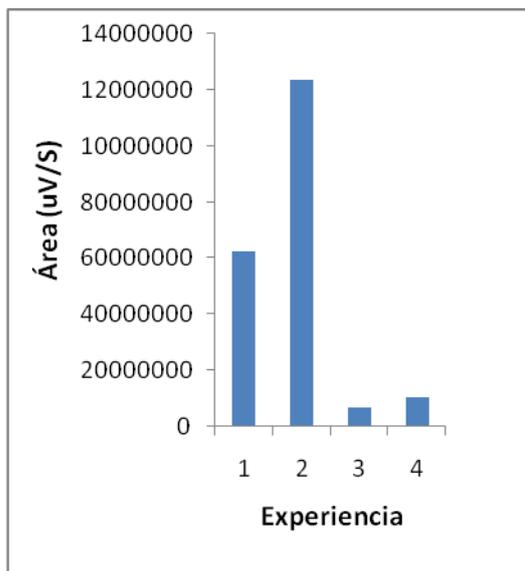


Figura N° 52-A. Área de naftaleno vs Experiencia

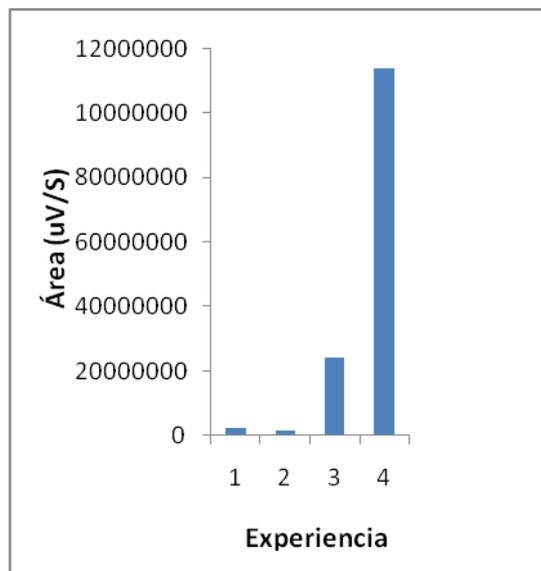


Figura N° 52-B. Área de antraceno vs Experiencia

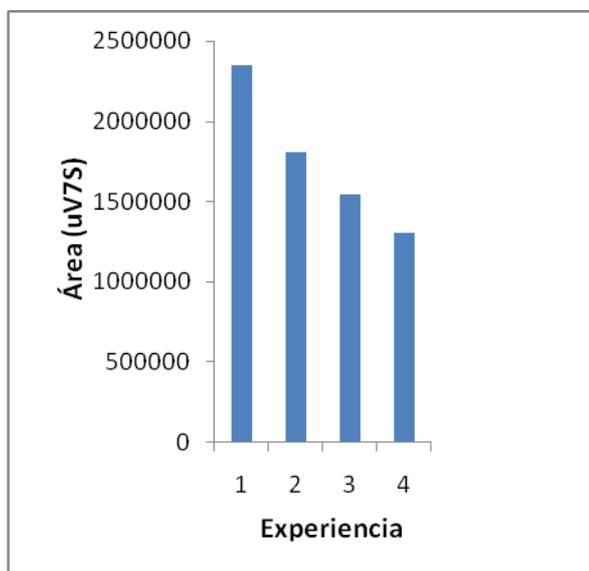


Figura N° 52-C. Área de pireno vs Experiencia

Por lo antes visto se comprueba que él no lograr una buena homogeneización de la muestra influye a la hora de cuantificar los HAPs en cuestión, ya que no nos permite obtener buena reproducibilidad referente a las áreas y esto fue observado

en los gráficos mostrados previamente en donde el naftaleno y antraceno posee un comportamiento irregular en las 4 experiencias realizadas, en cambio el área del pireno va decayendo a medida que se realicen mas experiencias.

Por lo que se puede decir que dicha técnica en cuestión, se puede emplear de un modo más cualitativo que cuantitativo motivado a que se obtienen resultados como los mostrados, es decir se puede emplear para detectar la presencia de los compuestos en cuestión.

Los cromatogramas obtenidos para las pruebas de repetitividad se pueden observar en el apéndice 5 figuras (A.5-1, 2, 3, 4).

7. CONCLUSIONES

- ✓ El proceso de la limpieza de la fibra es indispensable realizarlo entre cada experiencia a fin de evitar el efecto memoria.
- ✓ La fibra de 65 μm de PDMS-DVB es más sensible, ya que se obtuvo una mayor relación área/concentración con las muestras estudiadas.
- ✓ El orden de sensibilidad de las fibras empleadas, fue el siguiente:

Fibra 65 μm de PDMS-DVB > Fibra 30 μm de PDMS

- ✓ El proceso de homogeneización de la muestra por el método de EC-MEFS-CG, tiene un papel importante ya que permite obtener mayor señal de los HAPs.
- ✓ Para las condiciones de trabajo se logró observar que es posible identificar 11 de los 16 HAPs seleccionados por la Agencia Federal para la Protección del Medio Ambiente (US-EPA). El método de EC-MEFS-CG, es capaz de detectar hasta 9, los considerados más volátiles.
- ✓ Para las condiciones empleadas no se logró observar o determinar la presencia de Benzo(a)pireno.
- ✓ Se obtuvo señal correspondiente a los HAPs estudiados al emplear el método de ID-MEFS-CG, cuando se utilizó los patrones sólidos ya que al emplear el multipatrón no se obtuvo la misma, lo que nos indica que la concentración en que se encuentren estos cumple un papel importante a la hora de ser detectados.
- ✓ Para las muestras de trigo sólo se obtuvo la presencia de los HAPs en estudio empleando el método de EC-MEFS-CG, mientras no se observó la presencia de HAPs alguno por el método de ID-MEFS-CG.
- ✓ Las muestras de maíz arrojaron señal para antraceno y pireno por el método de ID-MEFS-CG, mientras que resultó ser más eficaz el método de EC-

MEFS-CG debido a que se observa señal para naftaleno, fluoreno, antraceno y pireno, por lo que se concluye que éste permite obtener los hidrocarburos en una mejor señal, logrando obtenerse un área mayor respecto a los resultados obtenidos por el método de ID-MEFS-CG.

- ✓ No se obtienen buenos resultados a la hora de realizar la repetitividad por lo que se considera que la técnica de MEFS-EC-CG puede ser empleada para detectar la presencia de los HAPs y no para cuantificarlos.

8. RECOMENDACIONES

- ✓ Emplear un cromatógrafo de gases acoplado con un espectrómetro de masas (GC-MS), aplicando las condiciones obtenidas para confirmar la presencia o no de los HAPs de forma más confiable.
- ✓ Estudiar si se observa el mismo comportamiento en otros tipos de cereales o muestras de alimentos.
- ✓ Evaluar otras técnicas de homogeneización para lograr mejorar la reproducibilidad del método de EC-MEFS-CG.

9. BIBLIOGRAFÍA.

- [1]. Thomas Wenzl. Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. Trends in Analytical Chemistry. Vol 25. (2006) 716-725.
- [2]. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Commission Regulation (EC) N° 1881/2006. Official Journal of the European Union. (2006) 364/5 – 364/24.
- [3]. SPME SUPELCO: <http://www.dexin.com.uy/htdocs/insumos/supelco/spme.htm>
- [4]. Pino Estévez, Verónica. Extracción y preconcentración micelar. Aplicación a la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de interés medioambiental. Tesis Doctoral. Universidad de Laguna. España. (2002).
- [5]. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Hidrocarburos Poliaromáticos http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/Enciclopedia OIT/tomo4/104_07.pdf, abril 2009.
- [6]. <http://www.industriaacuicola.com/PDFs/3.4%20-ContaminacionHidrocarburos.pdf>, abril 2009.
- [7]. www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/LIApregrado/archivos/guia%20de%20metodos%20de%20 analisis%20por%20H, abril 2009.
- [8]. http://html.rincondelvago.com/hidrocarburos-aromaticos-policiclicos_1.html, abril 2009.
- [9]. Steven J Letohay. Application of gas chromatography in food analysis. Trends in Analytical Chemistry. Vol 21 (2002) 686-697.
- [10]. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons US. EPA Method 8310 (1986)

- [11]. Javier Hernández Borges. Nuevas metodologías de análisis de pesticidas por electroforesis capilar. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna. España. (2005).
- [12]. Patricia Plaza-Bolaños, Antonia Garrido Frenich, José Luis Martínez Vidal. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends. Journal of Chromatography A. Vol 1217. (2010) 6303-6326.
- [13]. www.nist.com, octubre de 2010.
- [14]. Alejandra M. Peñalver H. aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medio ambiental. Tesis Doctoral. Universidad Roviral I Virgili. España (2002).
- [15]. Harris, Daniel C. Análisis Químico cuantitativo. Tercera Edición. Editorial Reverté. (2007).
- [16]. J. Pawliszyn. Applications of solid phase micro extraction. The Royal society of Chemistry. Cambridge. (1999).
- [17]. J.A. Koziel, J. Noah, J. Pawliszyn. Anal. Chem, Vol. 72 (2000) 5178.
- [18]. Katy M. Mendoza C. Desarrollo de una metodología para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en muestras de partículas atmosféricas utilizando microextracción en fase sólida en espacio confinado (EC-MEFS) por cromatografía de gases. Trabajo especial de Grado. UCV. Caracas (2008).
- [19]. Tatiana C. Osorio C. Estudio del contenido de metanol en aspartame por microextracción en fase sólida (SPME) y detección por cromatografía de gases con detectores de ionización a la llama (CG-FID). Trabajo Especial de Grado. UCV. Caracas (2006).
- [20]. Rubinson, K y Rubinson, J. Análisis Instrumental. Primera Edición Pearsons Educación S.A Madrid (2001)
- [21]. Skoog, Holler y Nieman. Principios de análisis instrumental. Quinta Edición. Editorial Mc Graw Hill. España. (2001)

- [22]. http://es.wikipedia.org/wiki/Cromatograf%C3%ADa_de_gases, abril 2009
- [23]. <http://www.pucpr.edu/titulov/Q420/Capitulo%2027%20A.pdf>, abril 2009.
- [24]. <http://www.monografias.com/trabajos48/detectores-cromatografia/detectores-cromatografia2.shtml>, abril 2009.
- [25]. <http://es.wikipedia.org/wiki/Triticum>, octubre 2010.
- [26]. <http://www.inn.gob.ve/modules.php?name=News&file=article&sid=551>, octubre 2010.
- [27]. <http://html.rincondelvago.com/el-maiz-en-la-alimentacion-humana.html>, octubre 2010.
- [28]. <http://www.aqc.com.ve/NormasCOVENIN/Catalogo/CatalogoCA Alimentos.htm> (Norma COVENIN 1935-87).
- [29]. <http://www.inn.gob.ve/modules.php?name=News&file=article&sid=747>, octubre 2010.
- [30]. <http://www.vtv.gob.ve/noticias-econ%C3%B3micas/38104>, octubre 2010.
- [31]. Gemma Perelló, Roser Martí-Cid, Victoria Castell, Juan M. Llobet, José L. Domingo. Concentrations of polybrominated diphenyl ethers, hexachlorobenzene and polycyclic aromatic hydrocarbons in various foodstuffs before and after cooking. *Food and Chemical Toxicology*. Vol 47. (2009) 709-715.
- [32]. Silvia A.V. Tfouni, Natali G. Souza, Milton Bertolani Neto, Ingrid S. D. Loredó, Fernanda M. Leme, Regina P. Z. Furlani. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sugarcane juice. *Food Chemistry*. Article in Press (2009)
- [33]. Leticia Rey-Salgueiro, Elena Martínez-Carballo, Mercedes Sonia García-Falcón, Carmen González-Barreiro, Jesús Simal-Gándara. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in infant foods. *Food Chemistry*. Vol 115. (2009) 814-819.

- [34]. Roser Martí-Cid, Juan M. Llobet, Victoria Castell, José L. Domingo. Evolution of the dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Catalonia, Spain. *Food and Chemical Toxicology*. Vol 46. (2008) 3163-3171.
- [35]. A. Ischizaki, K. Saito, S. Narimatsu, H. Kataoka. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of chromatography A*. Vol 1217 (2010) 5555-5563.
- [36]. Pilar Viñas, Natalia Campilo, Nerea Aguinaga, Eva Pérez-Cánovas, Manuel Hernández-Córdoba. Use of headspace solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea infusions. *Journal of Chromatography A*. Vol 1164. (2007) 10-17.
- [37]. Nerea Aguinaga, Natalia Campilo, Pilar Viñas, Manuel Hernández-Córdoba. Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in milk and related products using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. Vol 596. (2007) 285-290.
- [38]. <http://es.wikipedia.org/wiki/Tamizado>, octubre 2010.
- [39]. <http://es.wikipedia.org/wiki/Liofilizaci%C3%B3n>, octubre 2010.
- [40]. Jorge Moreira Vaz. Screening direct analysis of PAHS in atmospheric particulate matter with SPME. *Talanta*. Vol 60 (2003) 687-693.
- [41]. http://es.wikipedia.org/wiki/Ecuaci%C3%B3n_de_Langmuir, octubre 2010.
- [42]. <http://es.wikipedia.org/wiki/SPME>, octubre 2010.
- [43]. Mc Nair & Bonelli. *Basic Gas Chromatography*. Varian (1969).

APÉNDICE 1

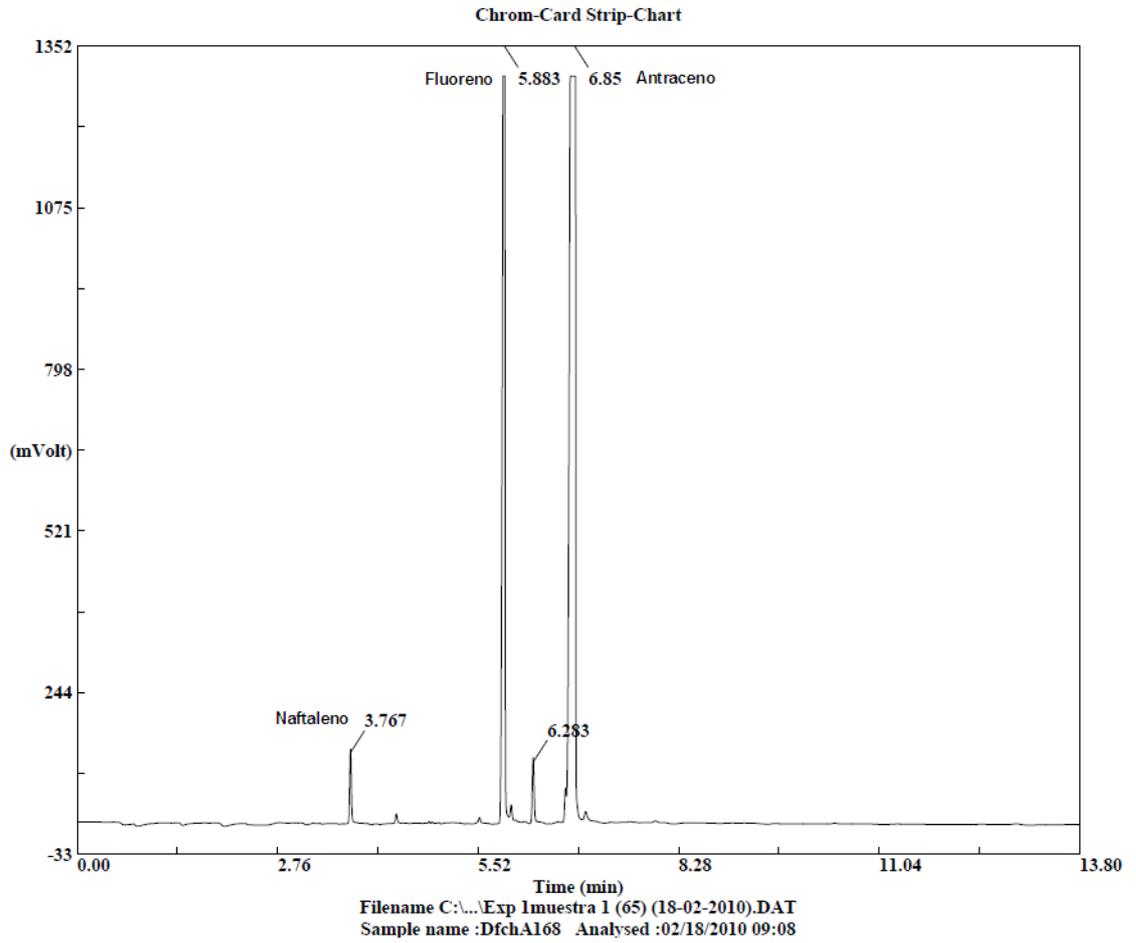


Figura A.1-1. Muestra de patrones puros (I), obtenida por EC-MEFS-CG, con la fibra de 65 μm de PDMS-DVB.

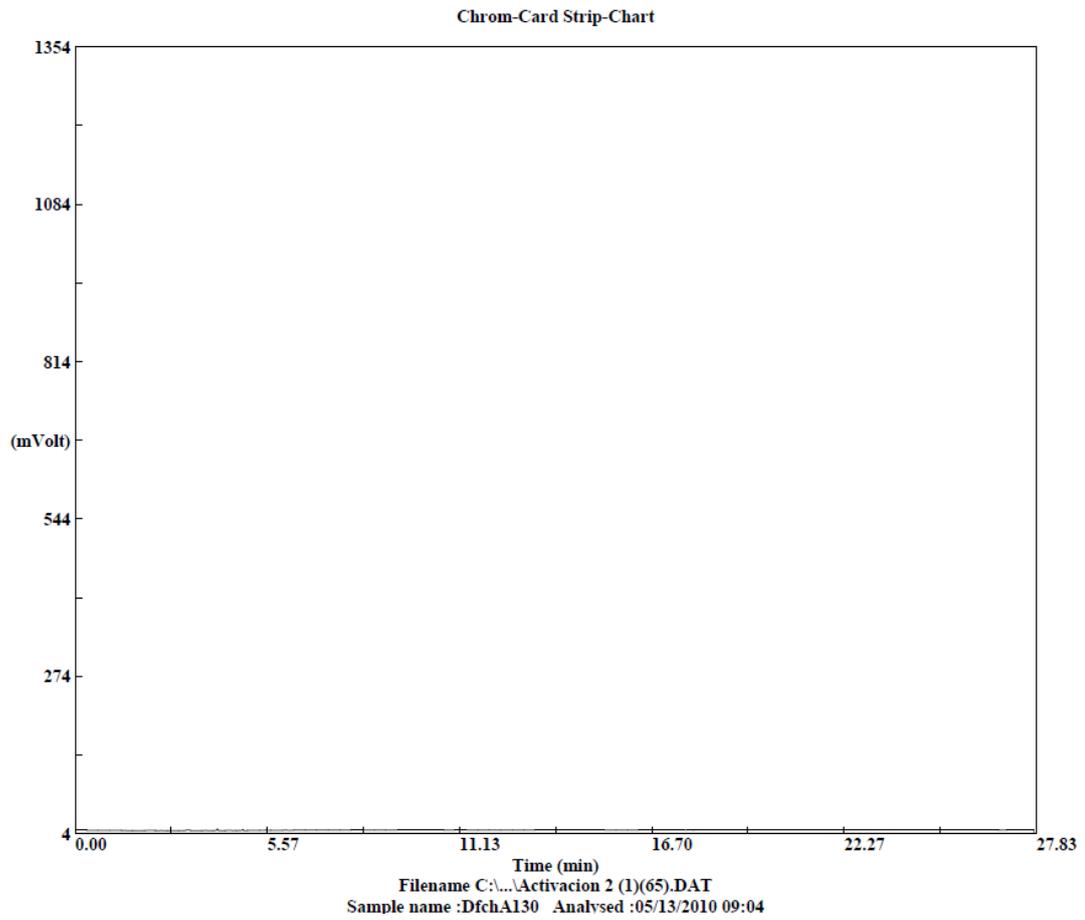


Figura A.1-2. Limpieza de la fibra de 65 μm de PDMS-DVB.

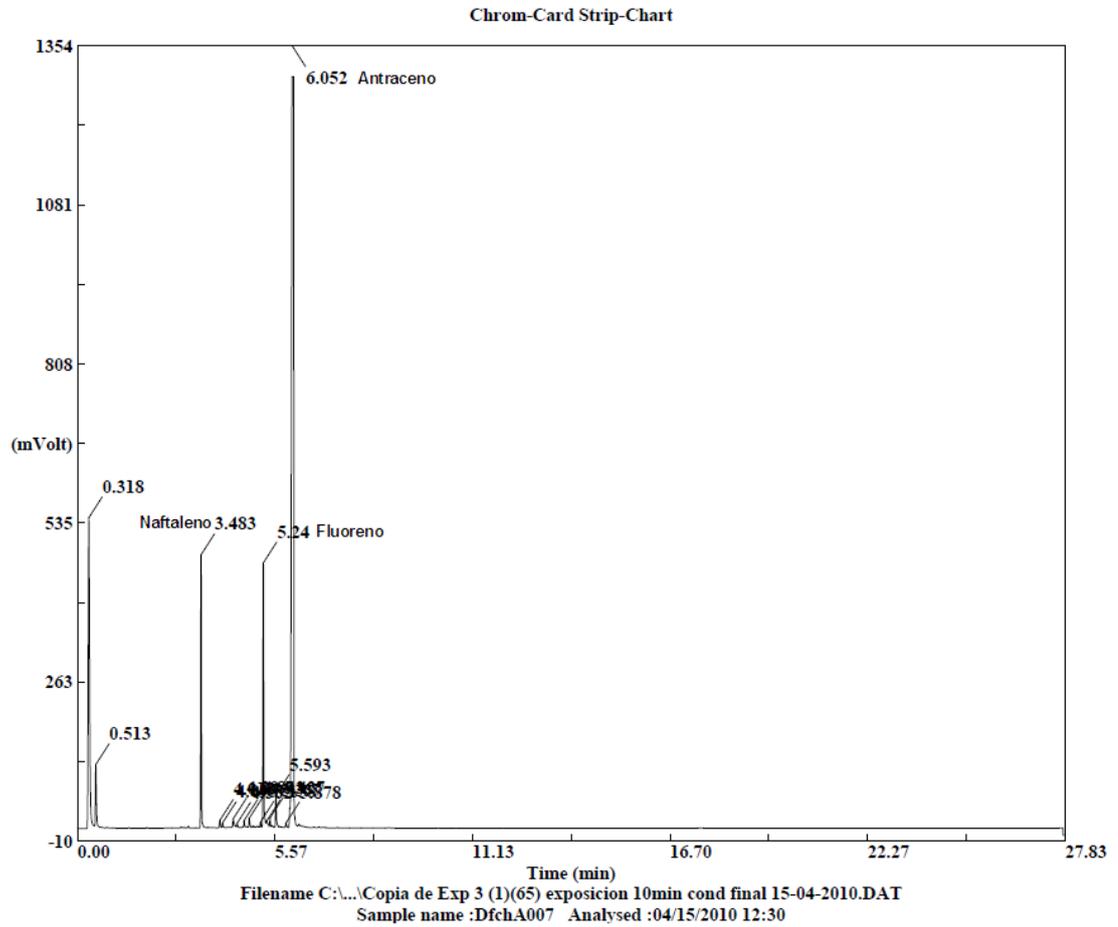


Figura A.1-3. Silica + multipatrón de referencia + muestra sintética (C), obtenida por EC-MEFS-CG, con la fibra de 65 μm de PDMS-DVB.

APÉNDICE 2

Isoterma Tipo I: Denominada isoterma de Langmuir y corresponde a una adsorción en monocapa.

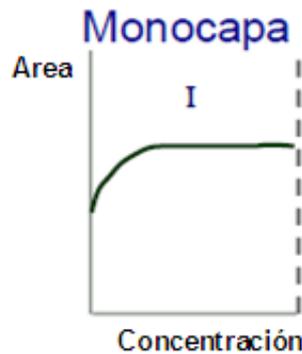


Figura N° A.2-1. Isoterma de Langmuir. Tipo I (monocapa).

En 1918 I. Langmuir dedujo la isoterma Tipo I, empleando un modelo simplificado de la superficie de un sólido:

- La superficie proporciona un cierto número de posiciones para la adsorción y todas son equivalentes
- Sólo se adsorbe una molécula sobre cada posición
- Su adsorción es independiente de la ocupación de las posiciones vecinas (las moléculas adsorbidas no interaccionan entre sí).

Las suposiciones usadas en la deducción de Langmuir no son completamente verdaderas ya que:

- Las posiciones de adsorción no son totalmente equivalentes, en la superficie aparecen bordes, esquinas y se ocuparán primero aquellas posiciones que den lugar a la formación de un enlace más estable.

APÉNDICE 3

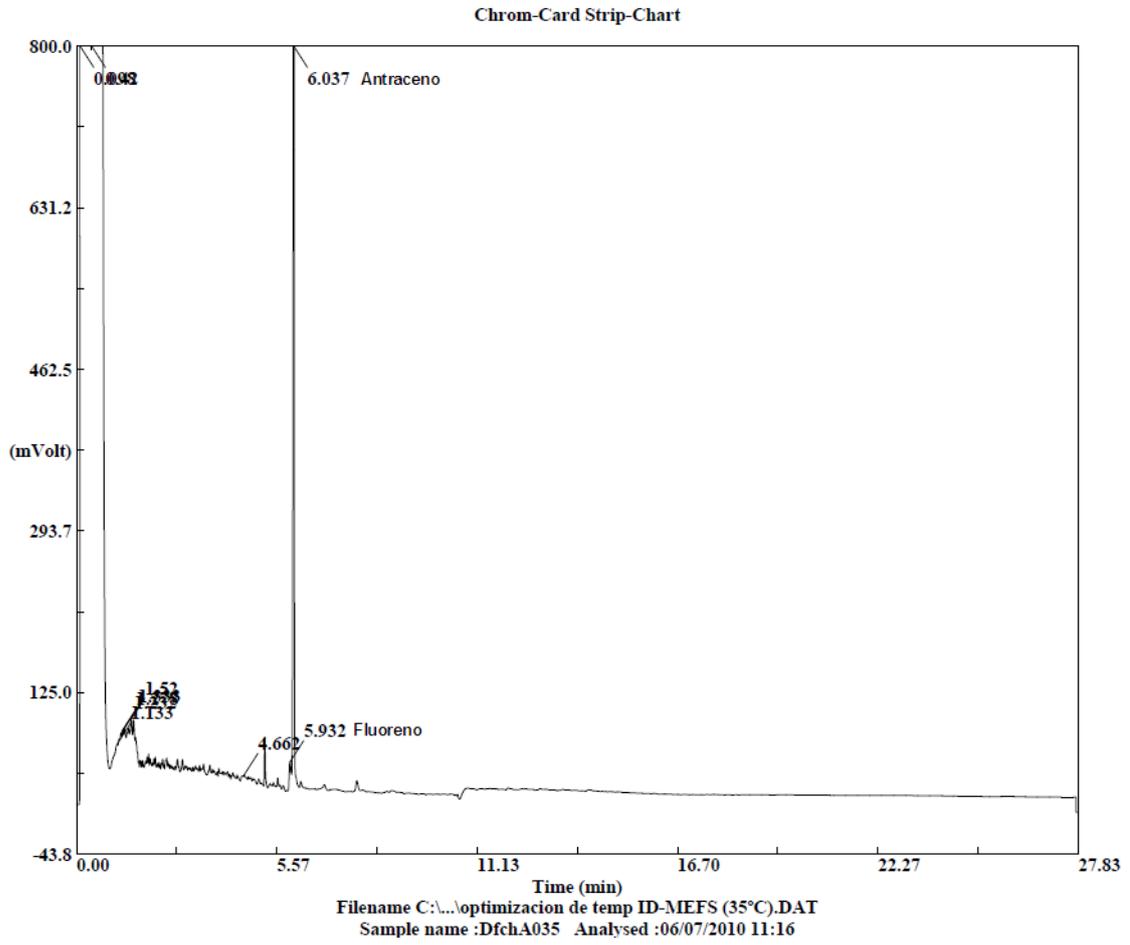


Figura A.3-1. Experiencia 1 temperatura 35 °C

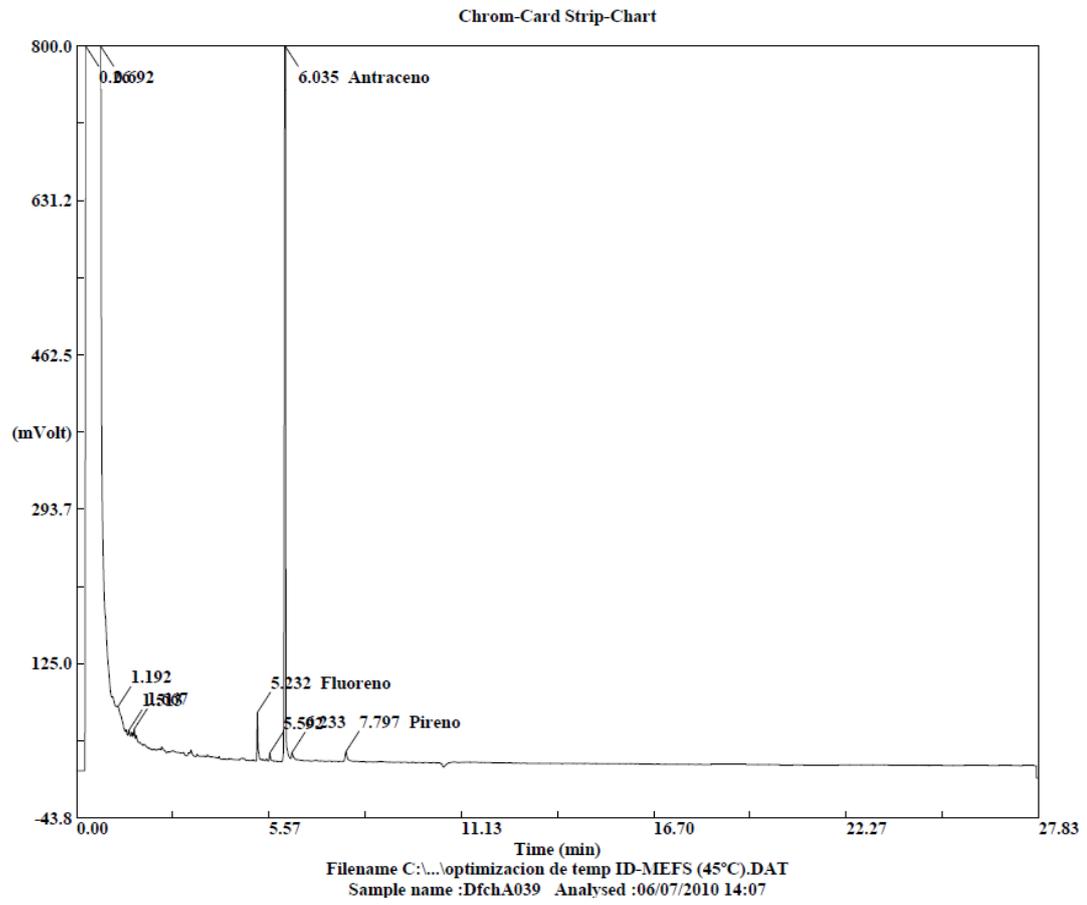


Figura A.3-2. Experiencia 2 temperatura 45 °C

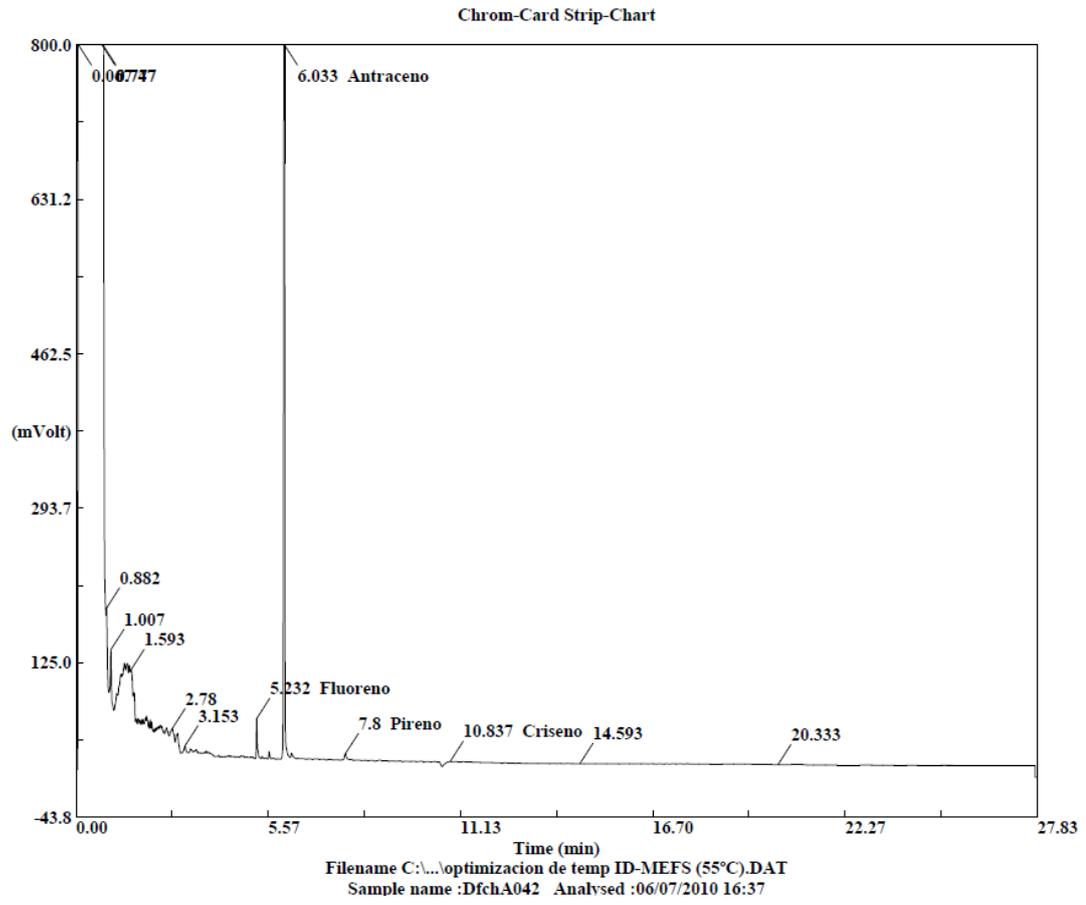


Figura A.3-3. Experiencia 3 temperatura 55 °C

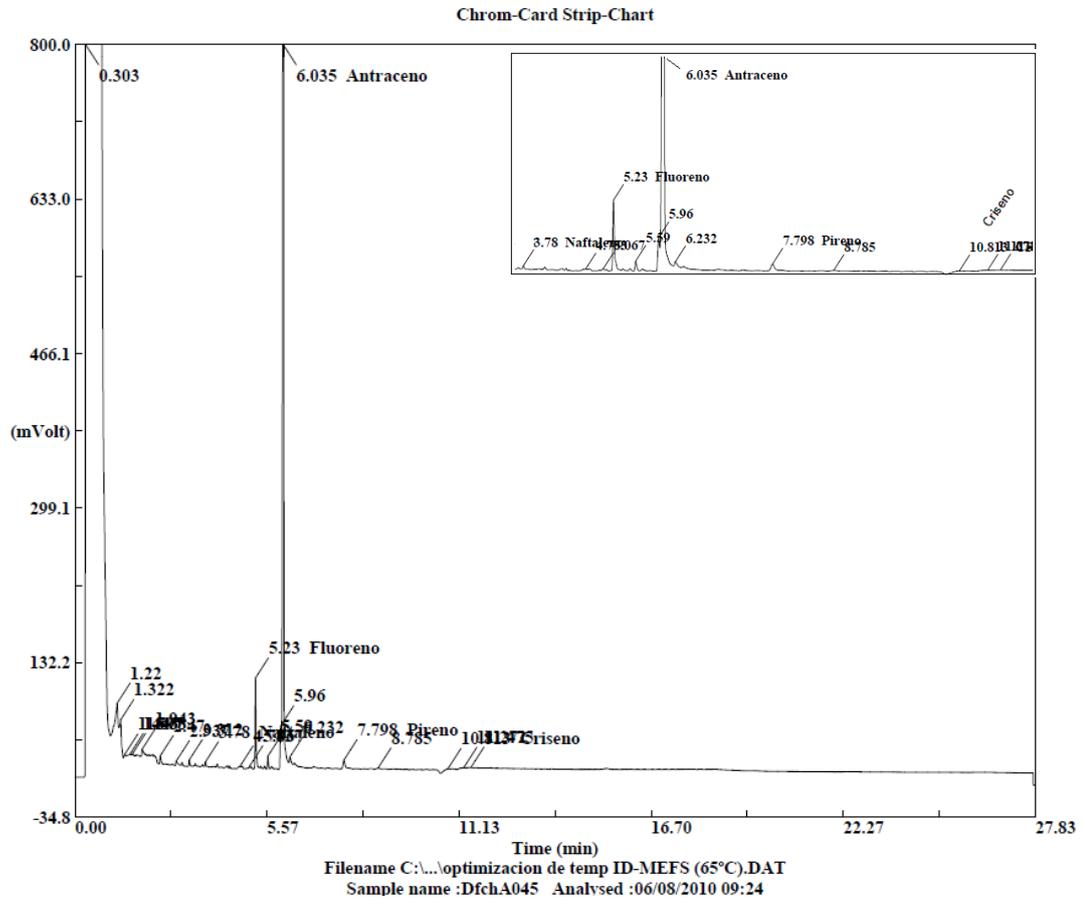


Figura A.3-4. Experiencia 4 temperatura 65 °C

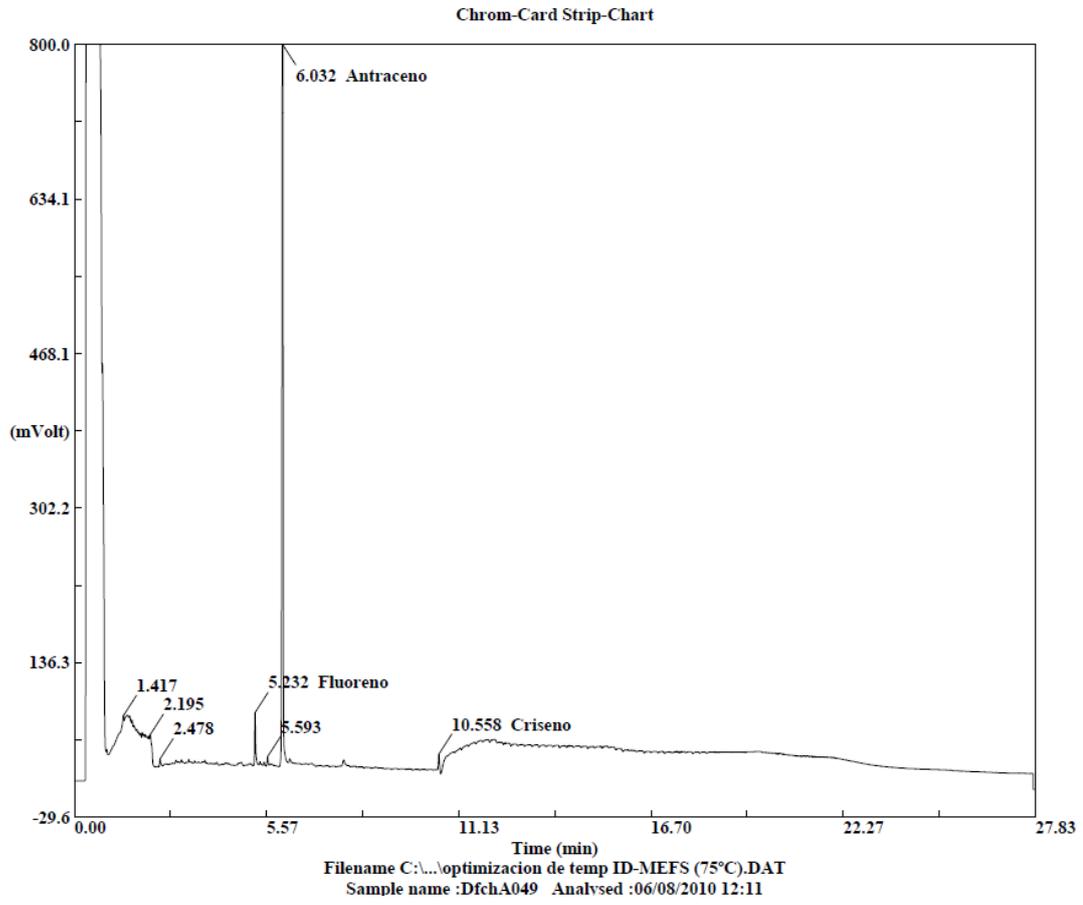


Figura A.3-5. Experiencia 5 temperatura 75 °C

APÉNDICE 4

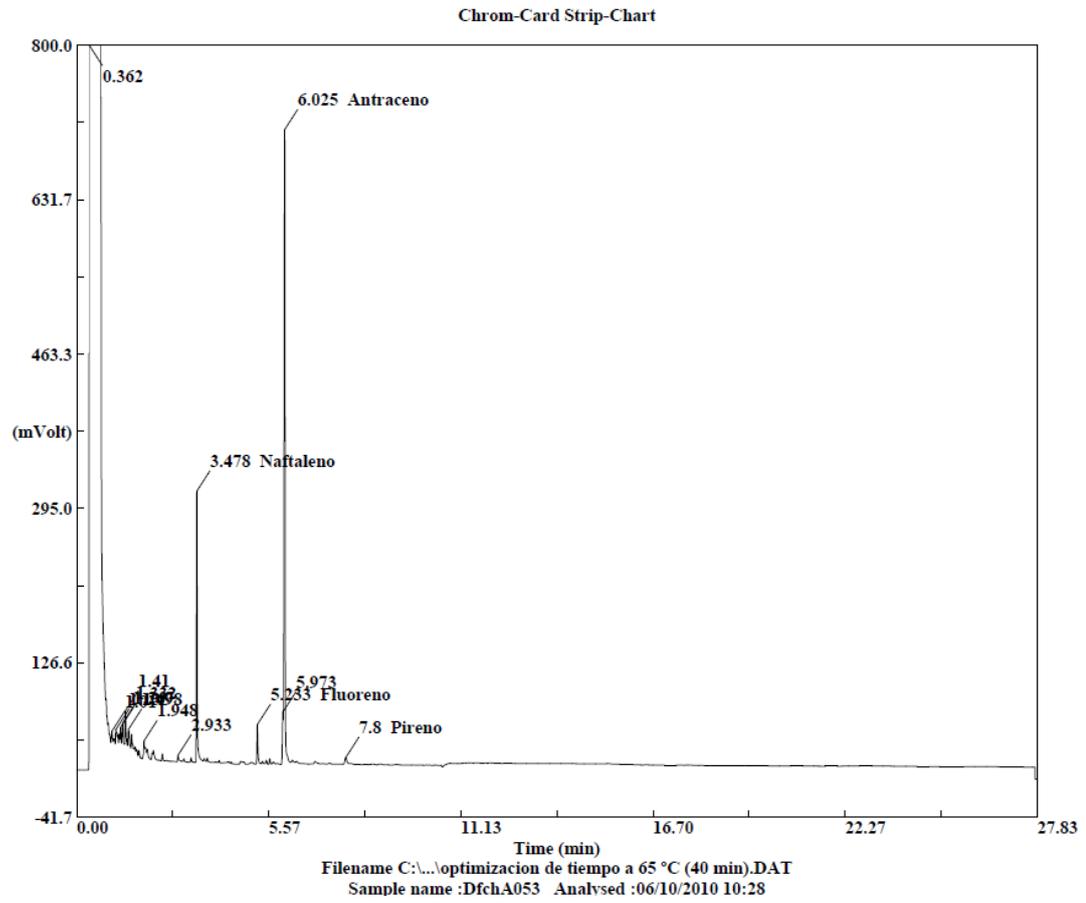


Figura A.4-1. Experiencia 1, Tiempo 40 min.

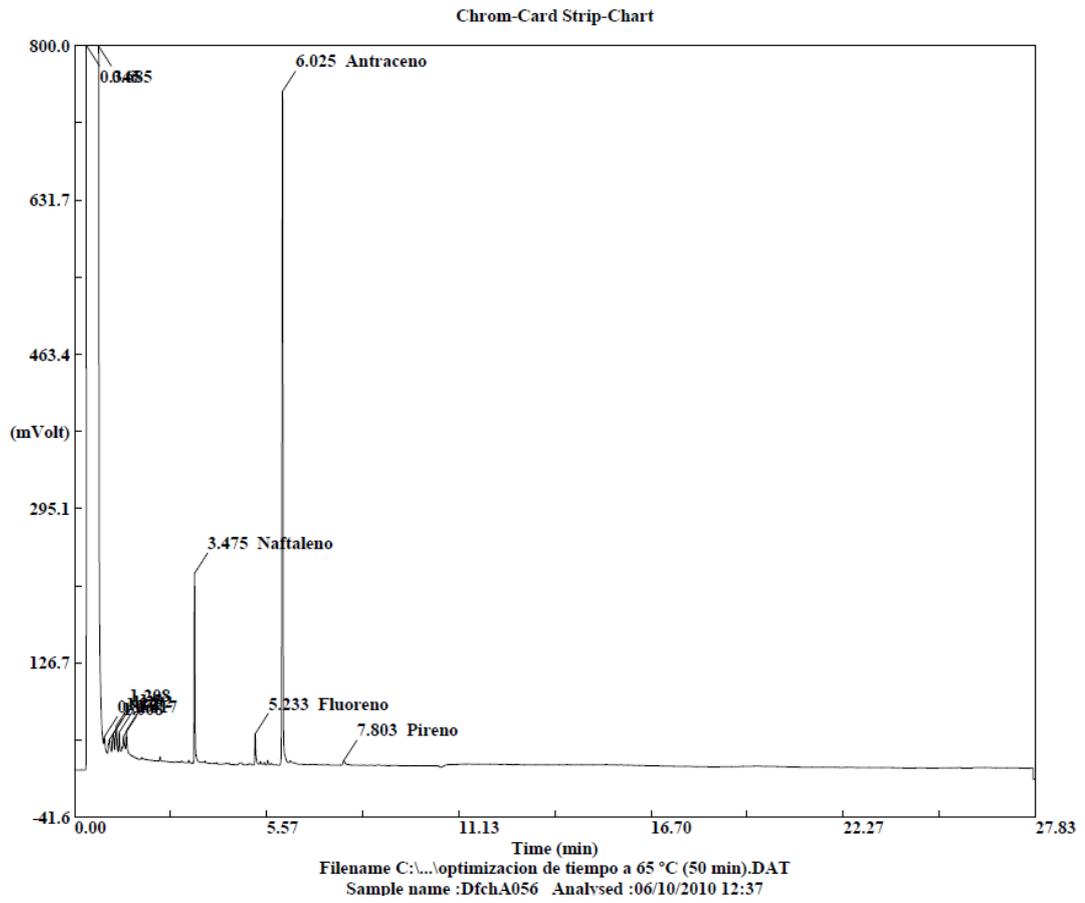


Figura A.4-2. Experiencia 2, Tiempo 50 min.

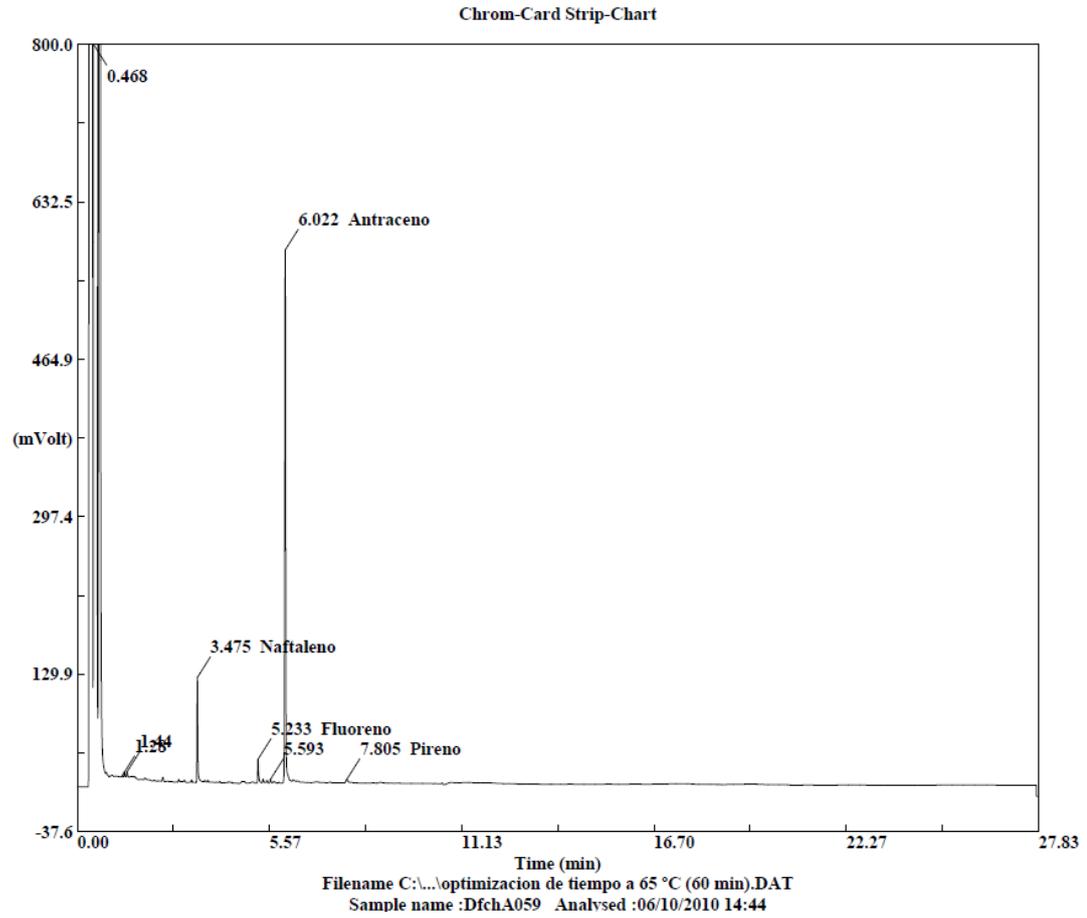


Figura A.4-3. Experiencia 3, Tiempo 60 min.

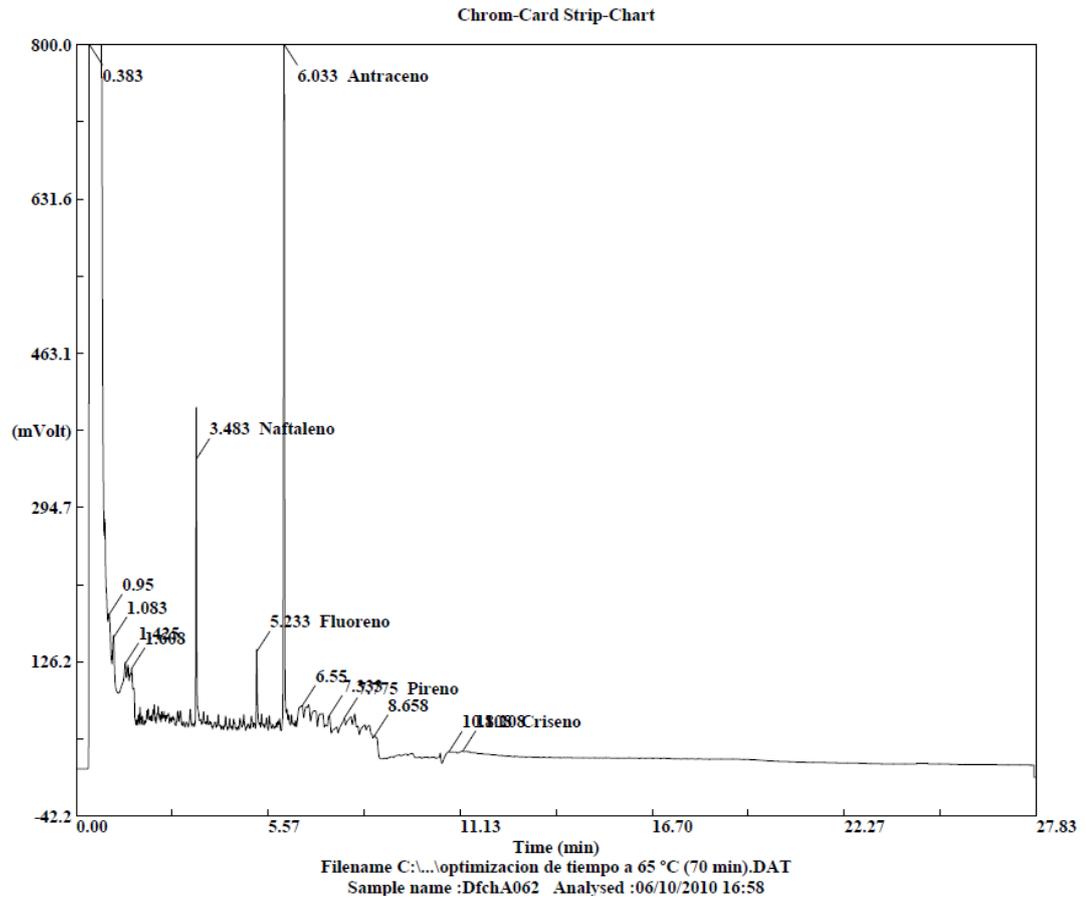


Figura A.4-4. Experiencia 4, Tiempo 70 min.

APÉNDICE 5

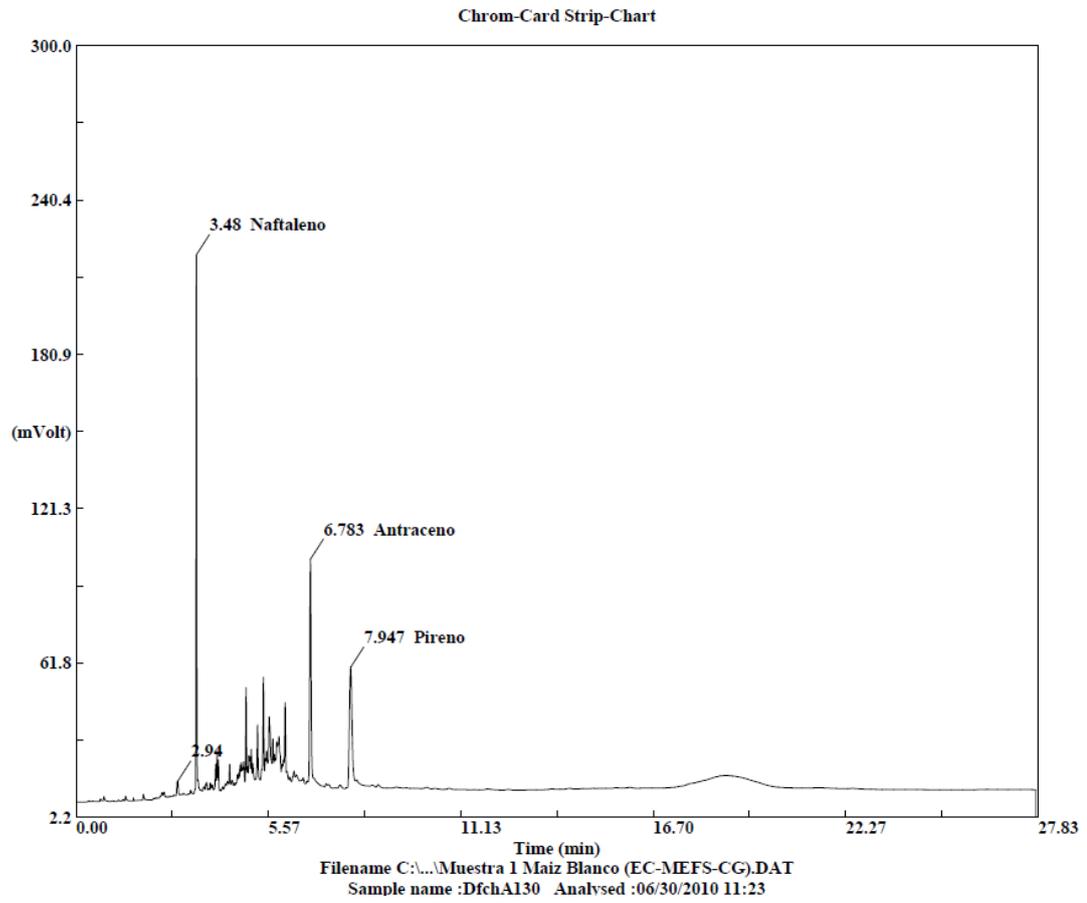


Figura A.5-1. Repetitividad muestra 1 de maíz blanco por EC-MEFS-CG, empleando la fibra de 65 μm de PDMS-DVB.

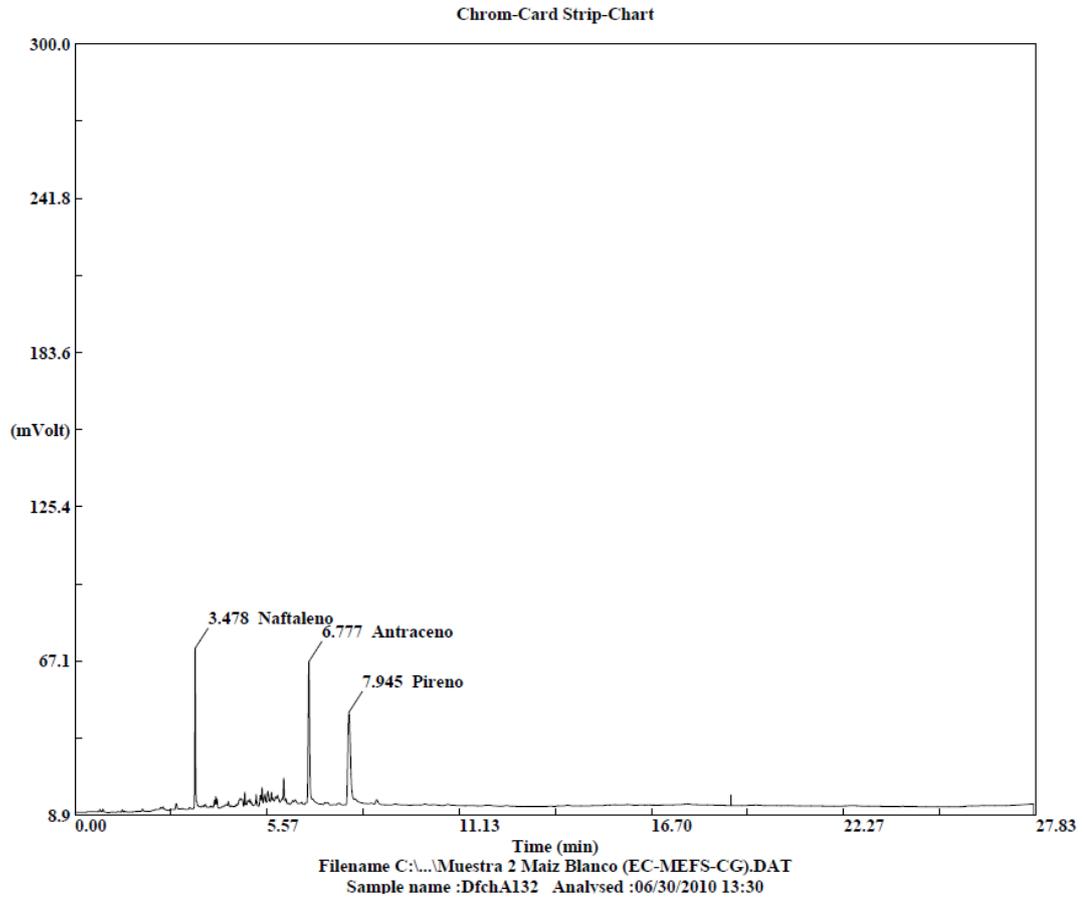


Figura A.5-2. Repetitividad muestra 2 de maíz blanco por EC-MEFS-CG, empleando la fibra de 65 μm de PDMS-DVB.

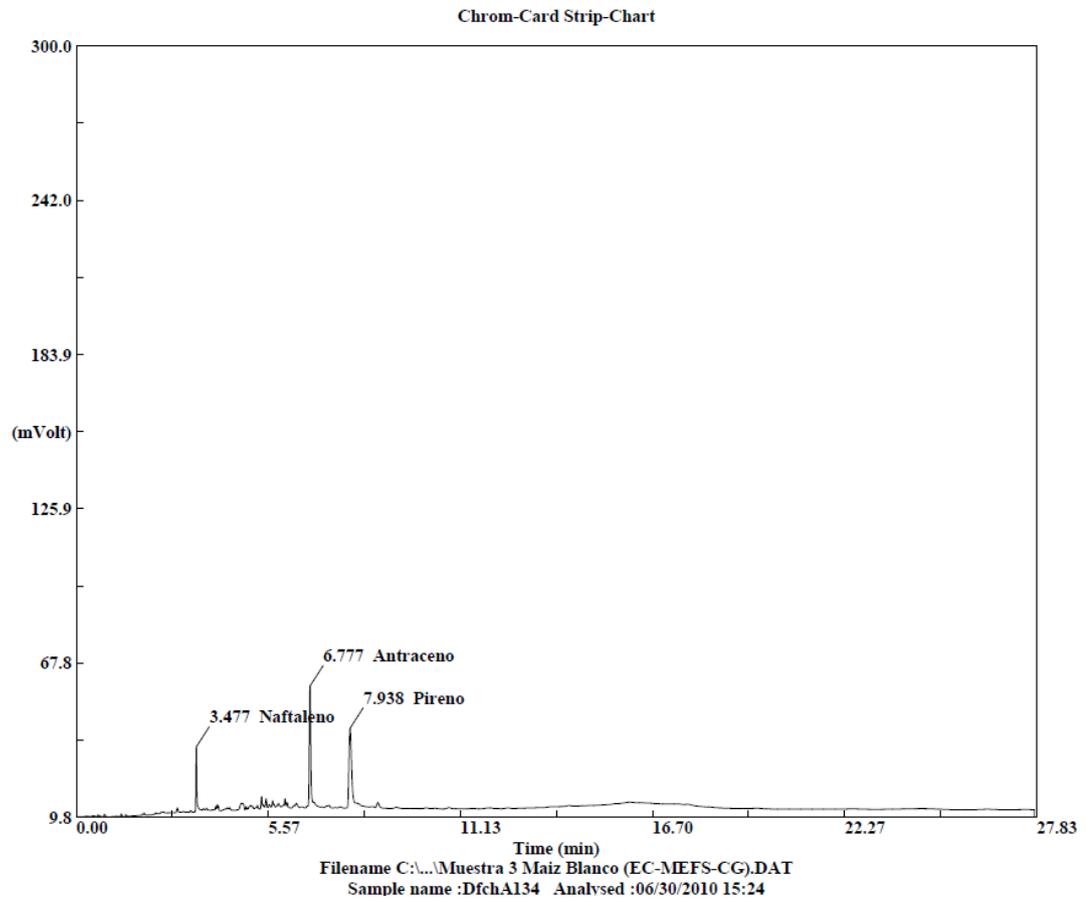


Figura A.5-3. Repetitividad muestra 3 de maíz blanco por EC-MEFS-CG, empleando la fibra de 65 μm de PDMS-DVB.

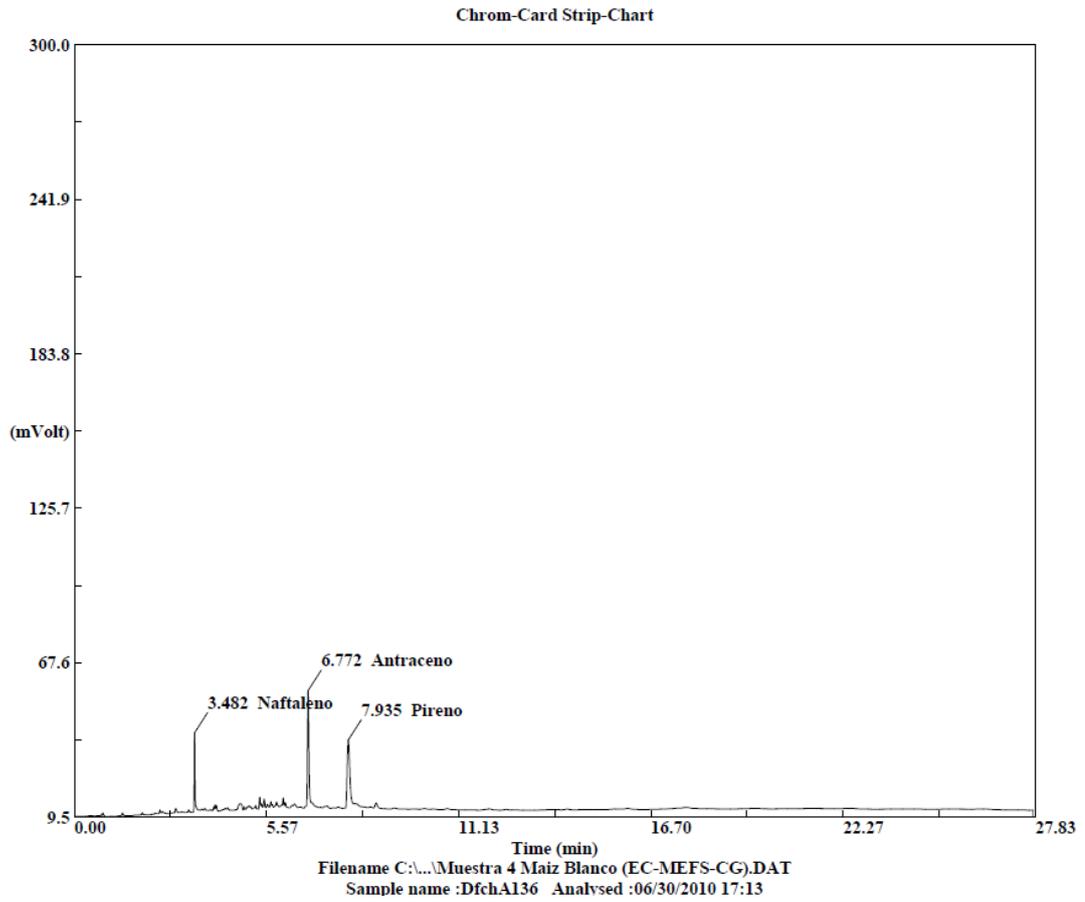


Figura A.5-4. Repetitividad muestra 4 de maíz blanco por EC-MEFS-CG, empleando la fibra de 65 μm de PDMS-DVB.

ACRÓNIMOS

BaP	Benzo(a)Pireno.
BTEX	Benceno, tolueno, etilbenceno, xileno.
CG	Cromatografía de gases.
COVENIN	Comisión Venezolana de Normas Industriales
CW	Carbowax.
DVB	Divinilbenceno.
EC	Espacio confinado.
EPA	Agencia Federal para la Protección del Medio Ambiente.
FSOT	columna tubular abierta de sílice fundida
FID	Detector de ionización a la llama.
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos.
HP	Hewlett Packard
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia.
HRW	Duro rojo de invierno
ID	Inmersión directa.
LMR	Límite máximo residual.
MEFS	Microextracción en fase sólida.
MS	Espectrometría de masas.
PA	Poliacrilato.

PDMS	Polidimetilsiloxano.
RSD	Desviación estándar relativa.
SCOT	Support coated open tubular.
SFC	Comité Científico de la Alimentación.
TCD	Detector de conductividad térmica.
TID	Detector termoiónico.
UE	Unión Europea.
UV	Ultravioleta-Visible.
WCOT	Wall coated open tubular.