

DOCUMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES EN EL
ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS EN AGUAS RESIDUALES

SERGIO ALEJANDRO MONTOYA PAVI
CARLOS ANDRÉS PÁEZ VALENCIA

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE QUÍMICA
PROGRAMA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA
PEREIRA
2012

DOCUMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES EN EL
ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS EN AGUAS RESIDUALES

SERGIO ALEJANDRO MONTOYA PAVI
CARLOS ANDRÉS PÁEZ VALENCIA

TRABAJO DE GRADO
Requisito final para optar el título de Tecnólogo Químico

Director
Qco MSc. JUAN PABLO ARRUBLA VÉLEZ

Asesor
Qco Ind. CARLOS HUMBERTO MONTOYA NAVARRETE

GRUPO DE ESTUDIO DEL RECURSO HÍDRICO

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE QUÍMICA
PROGRAMA DE TECNOLOGIA QUÍMICA
PEREIRA
2012

NOTA DE ACEPTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

DOCUMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES EN EL
ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS EN AGUAS RESIDUALES

Presentado por:

SERGIO ALEJANDRO MONTOYA PAVI
CARLOS ANDRÉS PÁEZ VALENCIA

Los suscritos director y jurado del presente trabajo de grado, una vez realizada la versión escrita y presenciado la sustentación oral, decidimos otorgar:

La nota de _____

Con la connotación: _____

Para constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy

Director: JUAN PABLO ARRUBLA VÉLEZ

Firma _____

Asesor: CARLOS HUMBERTO MONTOYA N

Firma _____

Jurado:

Firma _____

DEDICATORIA

A Dios por darnos fortaleza en los momentos difíciles.

A nuestras familias por su apoyo incondicional en todo momento para lograr esta gran meta que nos trazamos.

A nuestros amigos por acompañarnos y compartir diferentes momentos durante nuestros estudios.

A nuestros profesores por su conocimiento y paciencia hacia nosotros durante este tiempo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser nuestro guía espiritual.

A nuestras familias por estar siempre a nuestro lado acompañándonos y velar siempre por nuestro bienestar a pesar de las dificultades.

A nuestro director Juan Pablo Arrubla Vélez y asesor Carlos Humberto Montoya por el apoyo, conocimiento y dedicación para formarnos como profesionales y como personas durante todo este tiempo.

A todos los profesores de la escuela de química por los conocimientos aportados durante el transcurso de la carrera.

A nuestros amigos por compartir con nosotros en todo momento, y por hacer de nuestra estadía en la universidad un lugar más ameno.

GLOSARIO

AGUA POTABLE: Aquella que por reunir los requisitos organolépticos, físicos, Químicos y microbiológicos, en las condiciones señaladas en el presente decreto, puede ser consumida por la población humana sin producir efectos adversos a su salud

BTEX: Acrónimo que define la mezcla de benceno, tolueno, Etilbenceno, y los tres isómeros del xileno (orto, meta y para)

CROMATOGRAFÍA: Método de análisis químico para la separación de los componentes de una mezcla por distribución entre dos fases, una estacionaria y otra móvil.

CROMATOGRAMA: Representación gráfica de los picos de elución de una mezcla en un plano de coordenadas en cuya abscisa se encuentra el tiempo o volumen de retención y en ordenadas la señal del detector en milivolts (mV). Es el registro obtenido al representar gráficamente la salida de los distintos componentes de la mezcla.

CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC): Técnica analítica útil en la separación, identificación y cuantificación de los compuestos de una mezcla se fundamenta en la diferencia de velocidades de migración de sus compuestos individuales al ser arrastrados por un gas inerte a través de un tubo relleno de un material adecuado que soporta un medio líquido fijo o estacionario

DETECTOR: Dispositivo que responde a cierta característica del sistema que está sujeto a observación y convierte esa respuesta en una señal susceptible de medirse.

ESPECTROMETRÍA DE MASAS: Es una técnica analítica utilizada para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas.

EXTRACCIÓN: Procedimiento de separación de una sustancia que puede disolverse en dos disolventes no miscibles entre sí, con distinto grado de solubilidad y que están en contacto a través de una interfase

EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE): Técnica empleada en la preparación de muestras para análisis por cromatografía líquida, de gases, electroforesis, y espectrofotometría.

ESTANDARIZACIÓN: Procedimiento estadístico que consiste en verificar y documentar, que exista un alto grado de seguridad en la obtención de resultados que deberían ser precisos y exactos dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos.

EXACTITUD: Proximidad en la concordancia entre un resultado y el valor de referencia aceptado

FID: (FLAME IONIZATION DETECTOR) DETECTOR DE IONIZACIÓN POR LLAMA: Detector para cromatografía de gases que se basa en la captura de los iones producidos durante la pirólisis de analitos orgánicos en una flama.

LÍMITE DE DETECCIÓN: Cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Es comúnmente expresado como concentración del analito.

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN: Cantidad más pequeña del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable.

LÍNEA BASE: Es la parte del cromatograma que registra la respuesta del detector en ausencia del soluto o solvente

PICO CROMATOGRÁFICO: Es la parte del cromatograma que registra la respuesta del detector mientras que uno o más componentes son eluidos de la columna

PRECISIÓN: Expresa la cercanía entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreo de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas.

SPLIT: Modo de inyección con división de flujo, en el cual rápidamente se vaporiza la muestra antes de entrar a la columna. Una fracción definida de la muestra de vapor entra en la columna y el resto sale de la entrada a través de un orificio de ventilación.

SPLITLESS: Modo de inyección sin división de flujo, el cual utiliza una entrada divisora en donde la abertura de división de flujo se bloquea durante el periodo de inyección de tal manera que la mayor parte del vapor de la muestra entra en la columna.

US EPA: (United States Environmental Protection Agency) Agencia de protección ambiental de Estados Unidos.

VALIDACIÓN: Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que Se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista

CONTENIDO

	pág
ÍNDICE DE TABLAS	13
ÍNDICE DE FIGURAS	14
JUSTIFICACIÓN	16
OBJETIVOS.....	18
RESUMEN	19
CAPÍTULO 1	
GENERALIDADES	
1.1 DEFINICIÓN Y FUENTES DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS.....	20
1.2 PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS	21
1.2.1 PUNTOS DE EBULLICIÓN.....	21
1.2.2 PUNTOS DE FUSIÓN	21
1.2.3 SOLUBILIDAD	23
1.3 PROPIEDADES QUÍMICAS DE LOS HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS	24
1.4 USOS DE LOS HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS	25
1.5 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS (BTEX)	26
1.6 GENERALIDADES SOBRE LOS DIFERENTES TIPOS DE AGUAS RESIDUALES Y LEGISLACIÓN.....	27
CAPÍTULO 2	
IMPACTO AMBIENTAL	
2.1 RIESGOS DE LOS HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS	30
2.1.1 EFECTO DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS SOBRE HUMANOS	31
2.1.2 EFECTO DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS SOBRE ANIMALES	33

2.1.3 EFECTO DE HIDROCARBUROS SOBRE EL AGUA.....	34
--	----

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA EL ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS

3.1 RESEÑA HISTÓRICA	36
3.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES	38
3.2.1 APLICACIONES	39
3.2.1.1 ANÁLISIS CUALITATIVO	40
3.2.1.2 ANÁLISIS CUANTITATIVO	41
3.2.2 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES EN EL ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS.	41
3.2.3 INSTRUMENTACIÓN PARA LA CROMATOGRAFÍA DE GASES	42
3.2.3.1 GAS PORTADOR	43
3.2.3.2 SISTEMA DE INYECCIÓN DE MUESTRA	44
3.2.3.3 COLUMNA Y HORNO DE LA COLUMNA	45
3.2.3.4 SISTEMA DE DETECCIÓN	46
3.2.3.4.1 DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA (FID)	46
3.2.3.4.2 DETECTOR DE CONDUCTIVIDAD TÉRMICA (TCD).....	48
3.2.4 EJEMPLO DE APLICACIÓN DESARROLLADO POR LOS AUTORES: ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO PARA HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS	48
3.2.4.1 PATRONES	52
3.2.5 CROMATOGRAFÍA DE GASES/ ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG/EM)	52
3.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS MOLECULAR (EM)	54
3.3.1 CONSIDERACIONES TEÓRICAS	54
3.3.2 APLICACIONES	55
3.3.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LOS HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS	55

CAPÍTULO 4

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

4.1 RECOLECCIÓN Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA	59
4.2 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	60
4.2.1 CONSIDERACIONES TEÓRICAS	60
4.2.2 INTERACCIONES POLARES	62
4.2.3 INTERACCIONES APOLARES	62
4.2.4 VENTAJAS DE LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	64
4.2.5 REQUERIMIENTOS INSTRUMENTALES	64
4.2.6 PROCEDIMIENTO GENERAL EN EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	66
4.2.6.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO	69
4.2.6.1.1 PLANTEAMIENTO DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN PARA ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS (SPE).....	69
4.2.6.2 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA REALIZADO PARA HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS	71
4.3 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO	72
4.3.1 CONSIDERACIONES TEÓRICAS	72
4.3.1.1 EXTRACCIÓN SIMPLE	74
4.3.1.2 EXTRACCIÓN REPETITIVA	74
4.3.1.3 EXTRACCIÓN POR ETAPAS	75
4.3.2 APLICACIONES	75
4.4 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	77
4.5 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS	79
4.6 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO	81
4.7 EXTRACCIÓN MEDIANTE BARRA DE AGITACIÓN (STIR BAR)	82
4.8 TÉCNICA ANÁLISIS POR ESPACIO DE CABEZA ESTÁTICO O STATIC HEADSPACE ANALYSIS (HAS)	82

CAPÍTULO 5

ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

5.1 ESTANDARIZACIÓN	84
5.2 VALIDACIÓN	84
5.3 PARÁMETROS DE CALIDAD	84
5.3.1 EXACTITUD	85
5.3.2 PRECISIÓN	86
5.3.3 SELECTIVIDAD O ESPECIFICIDAD	86
5.3.4 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	87
5.3.5 LINEALIDAD Y RANGO	87
5.3.6 SENSIBILIDAD	88
5.3.7 ROBUSTEZ	89
5.4 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO PLANTEADO POR LOS AUTORES PARA EL ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS	89
5.4.1 INDICADORES DE RELACIÓN LINEAL	92
5.4.2 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO PARA EL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN USANDO SPE	93
5.5 CASO DE ESTUDIO SOBRE LA EVALUACIÓN DE CONDICIONES DE FUNCIONAMIENTO EN GC-FID PARA LA DETERMINACIÓN DE TPH.	93
CONCLUSIONES	97
BIBLIOGRAFÍA	98
ANEXOS	105

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Propiedades físicas de los hidrocarburos alifáticos_.....	23
Tabla 2. Puntos de fusión, puntos de ebullición y densidades de (BTEX)_.....	26
Tabla 3. Tiempos de retención y áreas medidas por el equipo, para Hidrocarburos alifáticos (patrón 40 ppm)_.....	51
Tabla 4. Relación m/z e Intensidad relativa de los picos mostrados en la figura 9 para el espectro de masas del hexano_.....	56
Tabla 5. Fases estacionarias usadas para extracción en fase solida_.....	63
Tabla 6. Condiciones para la extracción SPE de hidrocarburos alifáticos_.....	70
Tabla 7. Planteamiento porcentaje de recuperación Hidrocarburos alifáticos_.....	70
Tabla 8. Miscibilidad de diferentes disolventes usados en SPE_.....	77
Tabla 9. Parámetros de calidad de los métodos analíticos_.....	85
Tabla 10. Datos para el cálculo de %RSD para el n-Octano_.....	91
Tabla 11. Factores y sus niveles usados para el diseño D-Optimal_.....	94

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Imagen tridimensional de la molécula hexano_	22
Figura 2. Imagen tridimensional de la molécula octano_	22
Figura 3. Imagen tridimensional de la molécula tetradecano_	23
Figura 4. Diagrama de las partes básicas de un cromatógrafo de gases_	43
Figura 5. Detector de ionización de llama (FID)	47
Figura 6. Cromatograma patrón de 40 ppm de hidrocarburos alifáticos_	50
Figura 7. Cromatograma del solvente de elución (pentano)_	51
Figura 8. Espectro de masas de n-hexano_	56
Figura 9. Fases estacionarias apolares, y sus interacciones con los analitos_	62
Figura 10. Sistema Vacuum manifold para SPE_	65
Figura 11. Etapa de acondicionamiento SPE_	66
Figura 12. Etapa de carga de muestra SPE_	67
Figura 13. Etapa de lavado SPE_	67
Figura 14. Etapa de secado SPE_	68
Figura 15. Etapa de elución SPE_	68
Figura 16 Imagen de embudo para extracción líquido-líquido_	74
Figura 17. Esquema de dispositivo comercial de SPME_	78
Figura 18. Sistema de extracción asistida por microondas MSP-1000_	80
Figura 19. Curva de calibración del n-Octano_	91
Figura 20. Efectos generados al variar los factores establecidos para la evaluación de las condiciones de funcionamiento en GC-FID. _	95
Figura 21. Respuesta de la relación n-C40 y n-C20 variando el diseño de liner_	96
Figura 22. Cromatograma 100 ppm hidrocarburos alifáticos_	106
Figura 23. Cromatograma patrón 40 ppm de hidrocarburos alifáticos_	106
Figura 24. Cromatograma patrón 10 ppm de hidrocarburos alifáticos_	107

Figura 25. Cromatograma patrón 7 ppm de hidrocarburos alifáticos_	107
Figura 26. Cromatograma patrón 4 ppm de hidrocarburos alifáticos_	108
Figura 27. Cromatograma patrón 1 ppm de hidrocarburos alifáticos	108
Figura 28. Cromatograma patrón 0.7 ppm de hidrocarburos alifáticos_	109
Figura 29. Cromatograma patrón 0.1 ppm de hidrocarburos alifáticos_	109

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, uno de los problemas ambientales de mayor magnitud es la contaminación de ecosistemas por derrames de hidrocarburos, principalmente del petróleo y sus derivados, que ocurre en actividades de explotación y transporte de los mismos. Además del impacto ambiental negativo, los derrames de hidrocarburos generan impactos de tipo económico, social y de salud pública en las zonas aledañas al lugar afectado [1].

El desecho incontrolado de hidrocarburos alifáticos en aguas residuales, como en el caso de las aguas provenientes de lavado de estaciones de gasolina está creando un problema ambiental que puede generar complicaciones a largo plazo. En muchos casos no se realiza un control riguroso, en donde se regule los tipos de hidrocarburos y cantidad que están siendo arrojados

La absorción de estos hidrocarburos generalmente en el cuerpo humano es del 100%, y está comprobado que estas sustancias pueden traer efectos negativos sobre la salud con complicaciones renales y hepáticas; así mismo pueden llegar a ser depresores del sistema nervioso central (SNC) [2].

Los vertidos de hidrocarburos originan diferentes problemas fisiológicos y/o bioquímicos en los organismos afectados. Estos impactos van a tener consecuencias sobre su viabilidad y éxito reproductivo, pudiendo provocar alteraciones genéticas. Todos estos impactos determinan cambios en la eficacia biológica de los organismos afectados, y por lo tanto generan respuestas demográficas (cambios en el tamaño y crecimiento de las poblaciones de cada especie).

Estos cambios en las poblaciones, junto con las modificaciones en hábitat en que se encuentran, generarán cambios en las relaciones entre los diferentes componentes de los ecosistemas.

Entre los principales procesos afectados, cabe destacar:

1. alteraciones del hábitat
2. cambios en las relaciones entre predadores y presas
3. cambios en las relaciones entre competidores
4. alteraciones en los niveles de productividad
5. cambios en las redes tróficas, probablemente una de las claves para comprender los impactos en el ecosistema a medio y largo plazo [3].

Cuando se empezó a actuar sobre los espacios contaminados en el año 1980, el método solía consistir en retirar los residuos y/o suelo contaminado a un vertedero

o cubrirlos con una capa impermeable (confinamiento). Más tarde, se planteó la necesidad de desarrollar alternativas para solucionar de forma más permanente y menos costosa el problema de los espacios contaminados. En consecuencia, el desarrollo y uso de tecnologías más apropiadas para el tratamiento de suelos y aguas contaminadas ha avanzado mucho y en la actualidad es un tema de gran interés por sus repercusiones económicas y sociales.

La rápida expansión y la sofisticación creciente de diferentes sectores industriales, fundamentalmente en los últimos treinta años, se han traducido en un incremento de la cantidad y la complejidad de residuos tóxicos. Al mismo tiempo, se ha ido desarrollando una conciencia social de este peligro que lentamente va forzando el establecimiento de legislación para reducir la producción de residuos contaminantes y prevenir el escape de los mismos al medio circundante [4].

Desde el año 1980 se han reportado numerosos métodos para el análisis de diferentes hidrocarburos usando la técnica de cromatografía de gases, y algunas tendencias en cuanto al proceso de extracción previo como la extracción asistida por microondas, microextracción en fase sólida, extracción asistida por ultrasonido, extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida entre otras. En su gran mayoría se reporta sobre hidrocarburos BTEX (Benceno, tolueno, Etilbenceno, xileno) y sobre los diferentes hidrocarburos aromáticos, pero no se tienen grandes referencias sobre el análisis de hidrocarburos alifáticos por medio de la técnica de cromatografía de gases.

A nivel Departamental entidades como CARDER, y AGUAS Y AGUAS de Pereira requieren controlar rápida y adecuadamente este tipo de contaminantes, basándose en el artículo 35 del decreto 3930 de 2010 y en el decreto 1594 de 1984 especialmente en el artículo 73, el cual se refiere a la máxima cantidad permitida de sustancias solubles en hexano como en este caso los hidrocarburos alifáticos y el artículo 95 de este decreto que se refieren al control de estos vertimientos [5].

Es por ello que surge la necesidad de crear un documento, en donde se recopile la información y estudios realizados sobre la contaminación de hidrocarburos alifáticos en aguas residuales; y las respectivas técnicas para cuantificar y cualificar estos hidrocarburos; especialmente se enfocara sobre las técnicas de extracción en fase sólida, así como la cromatografía de gases con detector FID.

El trabajo también servirá como apoyo para futuros estudios en el Grupo de Investigación del Recurso Hídrico de la escuela de química de la Universidad Tecnológica de Pereira, y en los diferentes laboratorios de la región en donde se requiera estandarizar la técnica de cromatografía de gases para el análisis de hidrocarburos alifáticos.

OBJETIVO GENERAL

- Documentar la técnica de cromatografía de gases aplicada al análisis de hidrocarburos alifáticos en aguas residuales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aportar información para futuros trabajos de investigación sobre las diferentes técnicas de extracción de hidrocarburos alifáticos en aguas residuales.
- Documentar el desarrollo de la técnica analítica de cromatografía de gases para el análisis de hidrocarburos alifáticos.
- Presentar los distintos conceptos estadísticos requeridos cuando se desee estandarizar la técnica de cromatografía de gases para el análisis de hidrocarburos alifáticos en una matriz acuosa.

RESUMEN

En el presente documento se compilan los aportes bibliográficos en el estudio de la técnica de cromatografía de gases aplicada al análisis de hidrocarburos alifáticos en aguas residuales.

Además se hace énfasis en las distintas técnicas de extracción de hidrocarburos alifáticos de aguas residuales, principalmente extracción en fase sólida. También se exponen algunas investigaciones en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se muestran otras tendencias en cuanto al proceso de extracción previo de los hidrocarburos alifáticos en muestras de agua como lo son la extracción asistida por microondas, microextracción en fase sólida, extracción asistida por ultrasonido, extracción mediante barra de agitación (stir bar), y la técnica headspace.

Se indican informes a nivel internacional y nacional sobre el efecto de la contaminación de agua con hidrocarburos alifáticos. Así mismo se trata sobre los problemas generados a los organismos vivos, y los riesgos que ellos conllevan.

También se muestran los conceptos estadísticos de precisión, exactitud, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y sensibilidad, que se requieren cuando se desea estandarizar o validar una técnica cromatográfica.

CAPÍTULO 1

GENERALIDADES

1.1 DEFINICIÓN Y FUENTES DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS

Los hidrocarburos alifáticos son compuestos orgánicos no derivados del benceno. Están formados por átomos de carbono e hidrógeno, formando cadenas, las cuales pueden ser abiertas o cerradas. Los alcanos o hidrocarburos saturados alifáticos responden a la fórmula general C_nH_{2n+2} no poseen grupo funcional propiamente dicho y están constituidos exclusivamente por enlaces simples –C-C y C-H, donde los cuatro orbitales híbridos del carbono son equivalentes y están orientados hacia los cuatro vértices de un tetraedro regular.

Los hidrocarburos están muy repartidos en la naturaleza. Están presentes en los petróleos. Se escapan de las fisuras de los terrenos petrolíferos cantidades considerables de gases inflamables que se denominan gases naturales. A partir de ellos se obtienen los de peso molecular más bajo por destilación fraccionada.

La mayoría de los hidrocarburos que hoy se usan proceden del carbón, petróleo y gas natural. Estos dos últimos son fuentes principales de los alcanos. El gas natural es principalmente metano (80 a 85%) acompañado de cantidades progresivamente menores de etano, propano, butano y alcanos superiores. El petróleo, la fuente mayor de hidrocarburos, es una mezcla compleja de alcanos acompañados de cantidades variables de hidrocarburos cíclicos saturados y de hidrocarburos aromáticos (toluenos, xilenos y difenilos), con pequeñas cantidades de sustancias que contienen oxígeno (fenoles y ácidos carboxílicos), azufre y nitrógeno [6].

La demanda del petróleo en el mundo en el año 2010 alcanzó un récord de 88,3 millones de barriles al día. El mayor consumo se había registrado en el cuarto trimestre del año 2007 y fue de 88 millones de barriles al día. El crecimiento de la demanda tuvo lugar mayoritariamente en los países desarrollados.

Así, en China en el año 2010, la demanda del petróleo creció un 8% y en la India un 11%. En general, en el mundo la demanda de petróleo aumentó este año en 2,5 millones de barriles al día.

En los próximos dos años en el mundo se notará un crecimiento considerable de la demanda de crudo. Con eso, 85% del aumento de la demanda se producirá en los países en vías de desarrollo, aseguran los especialistas.

Desde el principio de 2010, Rusia consiguió mantener su estatus de superpotencia de materias primas al extraer 420 millones de toneladas de petróleo: un récord en la historia moderna del país.

En lo que va del año la extracción de crudo se incrementó en un 2,4%. En octubre el promedio de extracción diaria ascendió al máximo de los últimos 20 años, es decir, a 1,4 millones de toneladas al día.

Se estima que en 2011 la producción de petróleo en Rusia fue de 504,8 millones de toneladas, y en los próximos años, la previsión es de 500 millones de toneladas de petróleo. Los expertos argumentan que las inversiones en la industria del petróleo en 2020 ascenderán a unos 280.000 millones de dólares..

En 2009 Rusia produjo 494 millones de toneladas de petróleo. En términos de volumen de extracción, Rusia ocupaba el primer lugar al dejar atrás a Arabia Saudita, y se ubicó en el segundo puesto en exportaciones.

Colombia podría convertirse en un importante productor petrolero. Según la estadística divulgada, en los últimos tres años la producción de crudo en este país sudamericano ha crecido desde los 588.000 barriles diarios hasta más de 900.000. Además hay terrenos aún sin explorar. De este modo Colombia se convierte en el tercer productor de Sudamérica con una producción petrolífera creciente. Se espera que dentro de una década la inversión bruta en el sector petrolero de Colombia sume 100.000 millones de dólares [7].

1.2 PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS

1.2.1 PUNTOS DE EBULLICIÓN

Los hidrocarburos alifáticos son compuestos formados por carbono e hidrógeno. Pueden ser moléculas ramificadas o lineales de cadena abierta, saturada o insaturada.

Las moléculas más pequeñas son gases a temperatura ambiente (C1 a C4). Al aumentar el tamaño y la complejidad estructural de la molécula, ésta se hace líquida y su viscosidad aumenta con el número de carbonos (C5 a C16). Los hidrocarburos de alto peso molecular son sólidos a temperatura ambiente (mayores de C16). Los hidrocarburos alifáticos de uso industrial derivan principalmente del petróleo, que es una mezcla compleja de hidrocarburos [8].

1.2.2 PUNTOS DE FUSIÓN

Los alcanos son apolares, por lo que se disuelven en disolventes orgánicos apolares o débilmente polares. Los alcanos tienen densidades aproximadas de 0,7 g/ml, comparadas con la densidad del agua 1.0 g/ml. Los puntos de ebullición de los alcanos aumentan ligeramente a medida que aumenta el número de átomos de carbono, y por tanto las masas moleculares.

Las moléculas más grandes tienen mayores áreas superficiales, por lo que aumenta la atracción intermolecular de Van Der Waals. Al ser mayor esta fuerza, mayor es el punto de ebullición.

Al igual que los puntos de ebullición, los puntos de fusión son mayores al aumentar la masa molecular [8].

En las figuras 1, 2 y 3 se muestran las imágenes tridimensionales de las moléculas hexano, octano y tetradecano respectivamente.

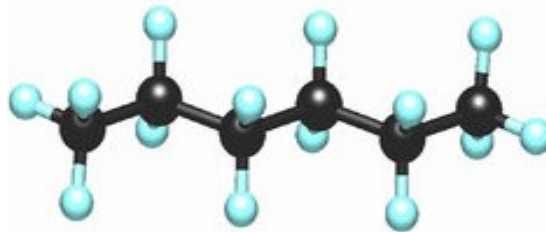


Figura 1. Imagen tridimensional de molécula hexano [9].

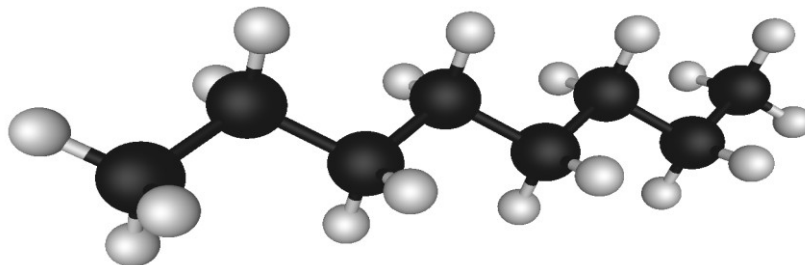


Figura 2. Imagen tridimensional de la molécula octano [9].

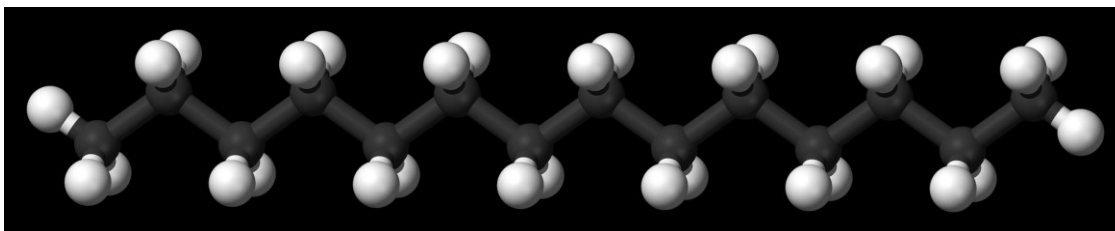


Figura 3. Imagen tridimensional de la molécula tetradecano [9].

En la tabla 1 se muestra las propiedades físicas (punto de ebullición, y punto de fusión) de hidrocarburos alifáticos desde carbono 5 a carbono 16.

Alcano	P.e (°C)	p.f (°C)
Pentano	36	-130
Hexano	69	-95
Heptano	98	-91
Octano	125.5	-57
Nonano	151	-51
Decano	174	-30
Undecano	196	-26
Dodecano	216	-10
Tetradecano	254	6
Pentadecano	271	10
Hexadecano	287	18
Heptadecano	303	23
Octadecano	317	28
Eicosano	343	37
Tetracosano	391	53
Octacosano	440	62
Dotriacontano	467	67
Hexatriacontano	497.1	76

Tabla 1. Propiedades físicas de los hidrocarburos alifáticos

1.2.3 SOLUBILIDAD

Los alcanos son apolares, por lo que se disuelven en disolventes orgánicos apolares o débilmente polares. Se dice que son hidrofóbicos (repelen el agua), ya que no se disuelven en agua. Son buenos lubricantes y protectores de los metales,

ya que evitan que el agua haga contacto con la superficie del metal y provoque su corrosión [8].

1.3 PROPIEDADES QUÍMICAS DE LOS HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS

Los hidrocarburos saturados poseen poca afinidad química, de ahí el nombre de parafinas. Su estructura solo presenta enlaces σ , por ello son muy estables. Sus reacciones la realizan por sustitución y son la mayoría de tipo radical. Todos son combustibles [10].

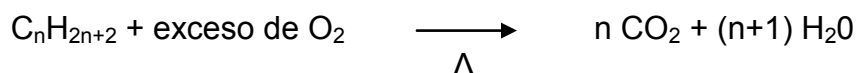
Aparte de las reacciones de combustión, los alcanos son pocos reactivos. De hecho, cuando una molécula contiene una parte hidrocarbonada (alquílica) y otra de naturaleza no alquílica, a menudo no se tiene en cuenta la parte alquílica ya que generalmente no interviene en la reactividad de la molécula. Los alcanos son poco reactivos ya que no tienen grupos funcionales, que suelen ser los responsables de que una sustancia reaccione.

Los grupos funcionales tales como los dobles enlaces, grupos hidroxilo o átomos de halógenos son los centros reactivos de la molécula. La mayoría de los compuestos orgánicos se caracterizan y se clasifican atendiendo a los grupos funcionales que contienen [8].

Las reacciones más comunes de los alcanos son combustión, y halogenación.

- Combustión:

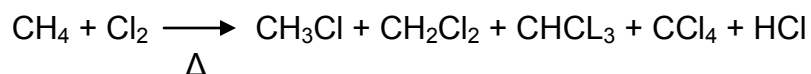
Es una oxidación rápida que transcurre a temperaturas altas, transformando los alcanos en dióxido de carbono y agua. En este tipo de reacción se necesita poco control, excepto para moderar la temperatura y controlar la relación combustible/aire con objeto de conseguir una combustión



- Halogenación:

Los hidrocarburos pueden reaccionar con los halógenos (F_2 , Cl_2 , Br_2 , I_2) para forma haluros de alquilo.

Normalmente se necesita calor o luz para iniciar una reacción de halogenación. La reacción de los hidrocarburos con cloro y bromo transcurre a velocidades moderadas y son fáciles de controlar; no obstante, las reacciones con flúor a menudo son demasiada rápidas y es difícil controlarlas. El Iodo o no reacciona o lo hace lentamente [8]



1.4 USOS DE LOS HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS

Los hidrocarburos saturados se utilizan en la industria como combustibles, lubricantes y disolventes. Una vez sometidos a procesos de alquilación, isomerización y deshidrogenación, pueden actuar también como materias primas para la síntesis de pinturas, revestimientos protectores, plásticos, caucho sintético, resinas, pesticidas, detergentes sintéticos y una gran variedad de productos petroquímicos

Los combustibles, lubricantes y disolventes son mezclas que contienen muchos hidrocarburos diferentes. Los alcanos son los componentes principales de los gases que se utilizan como combustibles (gas natural y gas licuado del petróleo), de la gasolina, del aceite de motor, del fuel oil y de la cera de parafina [8].

Los gases licuados del petróleo (GLP), constituidos principalmente por propano y butano, se transportan y almacenan a presión o como líquidos refrigerados y se utilizan también para aumentar el suministro de diferentes gases. Se emplean directamente como combustibles, sobre todo en trabajos metalúrgicos de alta calidad que requieren un combustible exento de azufre, en trabajos de soldadura y en todas aquellas circunstancias en que el aumento de la demanda de combustibles gaseosos por parte de la industria pesada no pueda ser cubierto por el suministro público.

Los gases licuados del petróleo se utilizan también como propulsores en muchos tipos de aerosoles, y los miembros superiores de la serie desde el heptano en adelante se utilizan como combustibles para motores y como disolventes. El isobutano se emplea para controlar la volatilidad de la gasolina y es un componente del líquido de calibración de instrumentos. El isooctano es el combustible utilizado como patrón de referencia para el octanaje de combustibles, y el octano es un ingrediente de los combustibles antidetonantes para motores. Además de ser un componente de la gasolina, el nonano es también un componente de los detergentes biodegradables. El principal uso del hexano es como disolvente de gomas, cementos y adhesivos para la producción de calzado, tanto de cuero como de plástico, la gasolina contiene aproximadamente el 1-3% de n-hexano. Los dos primeros elementos de la serie, el metano y el etano, son farmacológicamente inertes. Los hidrocarburos superiores al etano pueden considerarse dentro del grupo de los anestésicos generales. Los vapores de

estos hidrocarburos producen una ligera irritación de las mucosas. La intensidad de la irritación aumenta de pentano a octano [10].

Algunos componentes de la gasolina denominados BTEX (Benceno, Tolueno, Etilbenceno, orto-, meta-, para-xileno) que constituyen unas de las principales fuentes de contaminación de suelos, aire y aguas son usados ampliamente en industrias, tales como de impresión, pinturas, resinas sintéticas, gomas sintéticas y como intermedios químicos en la síntesis de diversos compuestos. A continuación (numeral 1.5) se muestran algunas generalidades de los hidrocarburos aromáticos BTEX para una mayor claridad de este tipo de analito.

1.5 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS (BTEX)

Los compuestos orgánicos volátiles son compuestos químicos que tienen una presión de vapor alta en condiciones normales para evaporarse significativamente y entrar en la atmósfera. Los hidrocarburos aromáticos como el benceno, tolueno, Etilbenceno, y los xilenos son algunos de estos compuestos los cuales se obtienen del carbón y del petróleo.

Los hidrocarburos aromáticos forman una gran familia de compuestos que tienen un núcleo común, el núcleo bencénico. El benceno contiene 92.3 % de carbono y 7.7 % de hidrogeno con la formula química C_6H_6 . La molécula de benceno se representa mediante un hexágono formado por los seis conjuntos de átomos de carbono e hidrogeno unidos con alternancia de enlaces simples y dobles [3, 8].

En la tabla 2 se recogen los puntos de fusión, puntos de ebullición y densidades del benceno y algunos de sus derivados.

Compuesto	pf (°C)	pe (°C)	Densidad (g/mL)
Benceno	6	80	0.88
Tolueno	-95	111	0.87
Etilbenceno	-95	136	0.87
o-xileno	-26	144	0.88
m-xileno	-48	139	0.86
p-xileno	13	138	0.86

Tabla 2. Puntos de fusión, puntos de ebullición y densidades de (BTEX)

Los hidrocarburos aromáticos flotan sobre el agua y son muy poco solubles en ella pero algo más que los alcanos. La solubilidad de los hidrocarburos aromáticos es de 3 a 5 veces mayor que la de los hidrocarburos alifáticos [11,12].

Se han realizado estudios a nivel local para la determinación de BTEX, en los cuales se ha usado la técnica de cromatografía de gases con detector FID y extracción en fase sólida. En la Universidad Tecnológica de Pereira se estandarizó la técnica de cromatografía de gases para la determinación de hidrocarburos aromáticos (BTEX) en matrices acuosas [13].

1.6 GENERALIDADES SOBRE LOS DIFERENTES TIPOS DE AGUAS RESIDUALES Y LEGISLACIÓN

A partir del año 1960, términos tales como contaminación del aire y del agua, protección del medio ambiente, ecología, pasaron a ser palabras de uso común. Antes de estas fechas estos términos pasaron desapercibidos por el ciudadano común, o eran términos que generaban confusiones. Como resultado de la gran variedad de procesos industriales, se han comenzado a producir aguas residuales de muy diverso tipo, lo que requiere tratamientos más complejos que ha ido apareciendo sucesivamente.

Las aguas residuales urbanas actuales tienen otro tipo de contaminantes más difíciles de tratar en comparación con las aguas residuales que se manejaban en décadas pasadas. Prácticamente todos los municipios en zonas industrializadas deben manejar una combinación de aguas domésticas e industriales. Los problemas técnicos y económicos que lleva consigo tales tratamientos obligan en muchos casos a hacer tratamientos separativos de aguas industriales, antes de su descarga en el alcantarillado municipal.

Las principales fuentes de aguas residuales son:

- Aguas domésticas o urbanas
- Aguas residuales industriales
- Escorrentías de usos agrícolas
- Pluviales

Así mismo, la composición de aguas residuales verdaderamente domésticas ha cambiado con la entrada en el mercado de una serie de productos nuevos, tales como detergentes sintéticos y otros productos de aseo [14].

En Colombia no se tiene una legislación clara en cuanto a la cantidad de hidrocarburos alifáticos permitida en aguas residuales; sin embargo se toman algunas medidas basándose en el decreto 3930 de 2010 que derogó el decreto 1594 de 1984 del ministerio del medio ambiente.

En el artículo 35 del decreto 3930 de 2010 del ministerio del medio ambiente se menciona:

Plan de contingencia para el manejo de derrames de hidrocarburos o sustancias nocivas. Los usuarios que exploren, exploten, manufacturen, refinan, transformen, procesen, transporten o almacenen hidrocarburos o sustancias nocivas para la salud y para los recursos hidrobiológicos, deberán estar provistos de un plan de contingencia y control de derrames, el cual deberá contar con la aprobación de la autoridad ambiental competente [15].

El artículo 36 del decreto 3930 de 2010 del ministerio del medio ambiente trata lo siguiente:

En caso de presentarse fallas en los sistemas de tratamiento, labores de mantenimiento preventivo o correctivo o emergencias o accidentes que limiten o impidan el cumplimiento de la norma de vertimiento, de inmediato el responsable de la actividad industrial, comercial o de servicios que genere vertimientos a un cuerpo de agua o al suelo, deberá suspender las actividades que generan el vertimiento, exceptuando aquellas directamente asociadas con la generación de aguas residuales domésticas [15].

El artículo 3930 de 2010 derogó al decreto 1594 de 1984, pero este último se podría tener en cuenta a la hora de emitir un juicio ya que registra un límite máximo de sustancias solubles en hexano de 100 mg/L.

El artículo 73 del decreto 1594 de 1984 del ministerio del medio ambiente hace énfasis en los vertimientos a alcantarillado público. En este caso interesa el ítem de la máxima concentración permitida para sustancias solubles en hexano el cual es de 100 mg/L [5].

El artículo 95 del decreto 1594 de 1984 del ministerio del medio ambiente suscita lo siguiente:

Se prohíbe el vertimiento de residuos líquidos sin tratar provenientes del lavado de vehículos aéreos y terrestres, así como el de aplicadores manuales y aéreos, recipientes, empaques y envases que contengan o hayan contenido agroquímicos u otras sustancias tóxicas [5].

Las contaminaciones pueden presentarse de 2 formas generales: puntuales y sistemáticas. Las primeras ocurren de manera fortuita en los cuerpos de agua donde generalmente no hay presencia de hidrocarburos. Las segundas son habituales y caracterizan a aquellas aguas que son contaminadas por la actividad humana que en ellas se realiza. Existen diferentes métodos analíticos que permiten estudiar este tipo de contaminación entre los que se encuentran la cromatografía gaseosa, métodos de partición gravimétrica y métodos espectroscópicos infrarrojo y ultravioleta [16].

La contaminación de las aguas por hidrocarburos en los sistemas de almacenamiento, en las fuentes de abastecimientos subterráneos y superficiales, así como en otros cuerpos de agua es un hecho que ocurre con relativa frecuencia. Este tipo de contaminación produce un cambio en las características organolépticas del agua que induce al rechazo de los consumidores, y su ingestión representa un riesgo para la salud; así mismo, el ecosistema puede sufrir afectaciones debidas al impacto negativo de estos contaminantes sobre sus diferentes componentes.

CAPÍTULO 2

IMPACTO AMBIENTAL

2.1 RIESGOS DE LOS HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS

La contaminación marítima por hidrocarburos se puede producir durante las operaciones cotidianas de los buques, ya sea de forma accidental, esto es, derrame de tanques, roturas de mangueras, de líneas, pérdidas de pequeñas cantidades del casco, errores personales durante maniobras; o de forma intencional, como los lastres sucios, el limpiado de tanques, sentinas, basura, aguas contaminadas. También se produce ocasionalmente por siniestros, los cuales, a pesar de que resultan visualmente muy impactantes, representan solo una mínima parte en proporción a la cantidad de contaminación causada por los hidrocarburos [17].

Un estudio realizado en la zona costera de costa rica demostró que las principales fuentes de contaminación provenían del transporte marítimo. Una de las evidencias de que ha ocurrido alguna contaminación por petróleo en las zonas son las breas y alquitranes que permanecen adheridos a las rocas o quedan dispersos sobre la arena, las manchas de tono café oscuro y las estelas resplandecientes en la superficie del agua [18].

Uno de los más grandes derrames de petróleo fue el que emano del pozo Macondo de British Petroleum en el Golfo de México en el 2010, es actualmente el peor de la historia de Estados Unidos, superando el derrame Exxon Valdez en Alaska en 1989

Los resultados preliminares de los cálculos del flujo de petróleo hecho por científicos que estudian el derrame, estimaron el vertido entre 12000 y 19000 barriles de petróleo por día.

Las estimaciones oficiales son, que el derrame del Exxon Valdez filtro casi 41 millones de litros de petróleo en Prince William Sound Cuando golpeo un arrecife.

En el desastre de la costa del Golfo, se calcula durante los primeros 34 días fueron liberados entre 64 y 102 millones de litros de petróleo en el golfo de México, suponiendo un flujo constante de petróleo desde que la torre de perforación petrolera Deepwater Horizon se hundió el 22 de abril hasta el 25 de mayo, un día antes de que se pusieran en práctica la operación “top kill” para tajar el pozo [19].

El 3 de julio de 1998 fueron vertidos al océano pacifico 18 mil barriles de crudo tras una ruptura en el oleoducto trasandino Ecuatoriano. El derrame afecto 45 kilómetros de costa Colombiana en el norte de Tumaco, Colombia

Otro importante derrame se presento el 18 de octubre de 1998 pero esta vez debido a un atentado terrorista. La compañía Cimarrones del ELN, dinamitó el oleoducto central de Colombia que pasa por la zona de Fraguas o Machuca, corregimiento del municipio de Segovia, Antioquia. Dicho ataque terrorista produjo el incendio del caserío, la muerte de 84 pobladores y otras personas heridas [20].

El 23 de Diciembre de 2011 en Dosquebradas, Risaralda se presento una explosión del poliducto de la Empresa Colombiana de Petróleos (Ecopetrol). La explosión se presentó por un movimiento de tierra, ocasionado por la lluvia, que generó la tensión y posterior ruptura del poliducto Salgar–Cartago causando un derrame de hidrocarburos en la quebrada Aguazul, el cual entró en contacto con una fuente de calor, generó varias explosiones y un incendio. Este hecho genero varias muertes y dejo bastantes personas heridas.

2.1.1 EFECTO DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS SOBRE HUMANOS

El contacto repetido o prolongado con la piel, la seca y desengrasa, con resultado de irritación y dermatitis. El contacto directo de los hidrocarburos líquidos con el tejido pulmonar (por aspiración) produce neumonitis química, edema pulmonar y hemorragia.

La toxicidad de los hidrocarburos de petróleo, tanto alifático como aromático, es muy variable pero, en general, aquellos de menor peso molecular son más tóxicos. Los hidrocarburos de la fracción ligera, generalmente entre 5 y 10 carbonos, son muy tóxicos pero muy volátiles y no perduran en un ambiente tropical. Un ejemplo fue un derrame de gasolina nafta en un arroyo en el sur del estado de Veracruz (México) ocurrido en enero 2004. Según la caracterización realizada no se encontraron hidrocarburos del petróleo en los sedimentos del arroyo después de dos meses.

En el medio tropical, los hidrocarburos que podrían perdurar después de un derrame o descarga son de la fracción media (C11-C28) y la fracción pesada C28+. De estos, son principalmente los hidrocarburos de bajo peso molecular de la fracción media los que son ligeramente tóxicas para diferentes tipos de plantas y la mesofauna del suelo, tales como las lombrices. Sin embargo, debido a la rápida biodegradación de estos compuestos, esta afectación es de muy corta duración.

Aunque los hidrocarburos meteorizados que quedan de derrames antiguos y en sitios remediados son de baja toxicidad o de muy corta duración, sí pueden afectar al rendimiento de forrajes y cultivos debido a alteraciones que no están relacionados con la toxicidad. Estos tipos de afectaciones son, en general, desconocidas por la comunidad normativa. Sin embargo, en los últimos años se han llevado a cabo, independientemente, varios estudios sobre este tema de zonas tropicales y subtropicales [21].

Desde el punto de vista farmacológico, los hidrocarburos superiores al etano pueden considerarse dentro del grupo de los anestésicos generales, en esa larga lista de sustancias conocidas como depresores del sistema nervioso central. Los vapores de estos hidrocarburos producen una ligera irritación de las mucosas. La intensidad de la irritación aumenta de pentano a octano. En general, la toxicidad de los alcanos aumenta al hacerlo el número de carbonos de la molécula. Asimismo, los alcanos de cadena lineal son más tóxicos que los isómeros ramificados.

Los hidrocarburos parafínicos líquidos son disolventes de grasas e irritantes primarios de la piel. El contacto repetido o prolongado con la piel, la seca y desengrasa, con resultado de irritación y dermatitis. El contacto directo de los hidrocarburos líquidos con el tejido pulmonar (por aspiración) produce neumonitis química, edema pulmonar y hemorragia. La intoxicación crónica por *n*-hexano o mezclas que contengan *n*-hexano puede causar polineuropatía.

El *n*-hexano es un hidrocarburo alifático (o alcano) de cadena lineal y saturado, con la fórmula general C_nH_{2n+2} y uno de la serie de hidrocarburos con puntos de ebullición bajos (entre 40 y 90 °C) que pueden obtenerse del petróleo mediante diversos procesos (craqueo, rectificación).

El *n*-hexano puede penetrar en el organismo por dos vías: por inhalación o a través de la piel. Sea cual sea la vía, la absorción es lenta. De hecho, las medidas de la concentración en equilibrio de *n*-hexano en el aire espirado han demostrado el paso de los pulmones a la sangre de una fracción del *n*-hexano inhalado de entre el 5,6 y el 15 %. La absorción a través de la piel es extremadamente lenta. El *n*-hexano produce los mismos efectos en la piel que otros hidrocarburos alifáticos líquidos. El resultado puede ser su rápida dilución en el aire alveolar y un descenso marcado del contenido de oxígeno, con asfixia y consiguiente lesión cerebral o parada cardíaca. El hexano exhibe una toxicidad aguda tres veces mayor que el pentano [21].

Un estudio realizado en la Amazonia por parte de la escuela de salud pública con sede en UMEO, Suecia con las comunidades indígenas de las provincias de Orellana y Sucumbíos investigó sobre los efectos del petróleo en la salud de los habitantes. Esta investigación se inició en 1997 y concluyó en el 2003 se

determinó que las mujeres que viven en comunidades donde se explota el petróleo tienen mayor riesgo de padecer dolores de cabeza, irritaciones de la garganta y ojos, así como enfermedades a la piel, que las que viven en otras zonas. Los riesgos de abortos también son 2,5 veces mayor. También en la investigación se determinó que la incidencia de cáncer en hombres y mujeres es alta. El riesgo de padecer leucemia en los niños menores de 14 años es 2,56 veces mayor, que los de otras zonas de la Amazonia donde no están las petroleras.

El estudio se realizó del agua de los ríos que consumen los habitantes y se comprobó que tienen alta cantidad de sustancias tóxicas y cancerígenas (benceno, tolueno y xileno). Las petroleras argumentan que el cáncer también obedece a otros factores como la salud y la nutrición [22].

Actualmente el instituto nacional de cáncer de los estados unidos, indicó que es preocupante la exposición a los hidrocarburos ya que pueden causar alteraciones en el ADN. Estos compuestos al encontrarse ampliamente difundidos en el ambiente, cada vez se le relaciona más con el aumento de casos de cáncer, principalmente en niños, en cuya población se han incrementado las leucemias [22].

2.1.2. EFECTO DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS SOBRE ANIMALES

Para estimar el riesgo que representa el consumo de suelo con hidrocarburos para el ganado es necesario conocer la toxicidad de los hidrocarburos para el animal, así como su tasa de ingesta de suelo. El riesgo para el ganado por la ingesta de suelo es una dosis mayor a 211 mg de petróleo por Kg de masa del ganado bovino por día [23].

En cuanto al efecto que producen los hidrocarburos en los organismos marinos hay diferencia notable en el comportamiento de diferentes organismos ante la contaminación con petróleo. Los moluscos bivalvos (almejas, mejillones), por ejemplo, muestran muy baja capacidad de eliminación del contaminante y, aunque muchos organismos como algunos peces por ejemplo, no sufren daños importantes con concentraciones del producto de hasta 1000 ppm, algunas larvas de peces se ven afectadas con niveles tan bajos como 1 ppm [23].

La contaminación por hidrocarburos puede tener efectos nefastos sobre los ecosistemas. En la cadena alimenticia, por ejemplo, el petróleo contamina el plancton, el cual es la fuente de alimento de muchos organismos marinos, entre ellos los peces, quienes a su vez sirven de alimento a peces más grandes, cetáceos, aves, humanos. Los peces no sólo son envenenados al ingerir alimento contaminado, también cuando el hidrocarburo entra en su organismo a través de las agallas destruye los huevos y algunos contaminados pueden producir descendencia deforme.

Las aves al tratar de limpiar sus plumas lo ingieren y mueren entonces por intoxicación; además el peso del crudo, aparte de que las puede hacer ahogar si se encuentran lejos de costa, no les permite volar lo que condiciona su sobrevivencia al no poder buscar el alimento.

En el caso de los mamíferos marinos la piel pierde su capacidad aislante muriendo así, por pérdida de calor corporal. A los delfines y ballenas el petróleo les taponan las vías respiratorias y mueren asfixiados. El crudo de petróleo en las playas se solidifica y cubre el hábitat de los moluscos crustáceos y otros organismos que los habitan. En el área submarina puede llegar a cubrir en masa sólida ecosistemas de arrecifes coralinos [24].

2.1.3 EFECTO DE HIDROCARBUROS SOBRE EL AGUA

El efecto producido en la zona costera y en general en el ambiente marino causado por el petróleo y sus derivados, ha sido de gran interés científico a nivel mundial. Los derrames o accidentes petroleros ocurridos en zonas templadas y frías han sido estudiados y documentados, demostrándose sus efectos nocivos a corto plazo sobre las comunidades marinas. Los daños no solo dependen de la cantidad vertida, sino también del lugar, época del año y tipo de petróleo.

Por el contrario, en las zonas tropicales y sub-tropicales no existe suficiente información sobre este problema, lo que a menudo dificulta realizar una evaluación correcta de los impactos de petróleo en los ecosistemas marinos y costeros.

El potencial tóxico del petróleo varía significativamente entre los petróleos crudos y los productos de refinación dependiendo del tipo de componentes que estén presentes en ellos. Así, los compuestos más tóxicos y dañinos son los más volátiles que en un derrame se evaporan fácilmente y en un mar tropical, donde las temperaturas del agua son más altas y con un alto nivel de radiación solar, los hidrocarburos se intemperizan gradualmente en relación directa al tiempo de exposición en el medio marino.

Los compuestos del petróleo al ser introducidos al ambiente acuático sufren interacciones con el medio donde se transforman estos compuestos; estas interacciones a su vez son reguladas por las condiciones climáticas y meteorológicas de la zona [25].

En el agua, los hidrocarburos se esparcen rápidamente, debido a la existencia de una importante diferencia de densidades entre ambos líquidos, llegando a ocupar extensas áreas, y dificultando por lo tanto sus posibilidades de limpieza. Se crea una capa de unos pocos micrones de espesor lo que imposibilita la interacción

entre la flora y la fauna marina con la atmósfera, obstruyendo así el ciclo natural de vida.

Si las sustancias contaminantes alcanzan la costa, debido a la alta permeabilidad de la arena, los hidrocarburos pueden penetrar hacia el subsuelo contaminando las napas y dejar rastros irreparables en los reservorios de agua dulce.

Anualmente se vierten al mar entre 3 y 4 millones de toneladas de petróleo. Sólo un 12% de la contaminación marina por hidrocarburos procede de los siniestros petroleros, el resto se debe a operaciones rutinarias. Las actividades navales son responsables del 33% de los derrames de petróleo en el ambiente marino, los accidentes de los buques petroleros sólo el 12%, y las instalaciones terrestres y descargas urbanas del 37%

Las actividades de exploración y explotación de los fondos marinos, constituyen una muy importante fuente de contaminación. Se estima que 130000 toneladas se vierten por año en el mar desde plataformas petrolíferas marinas. Se ha calculado que la pérdida y derrame crónico de petróleo asociado a su producción en el mar es de 100 Kg de vertido de crudo cada 1000 toneladas extraídas.

Un gran problema radica en lo que se debe hacer cuando las plataformas marinas quedan obsoletas. En general, las empresas multinacionales están a favor de su hundimiento, sin tener en cuenta los daños ecológicos que se pudieren ocasionar. Otra importante causa de contaminación la constituyen los vertidos de desechos industriales que llegan a poseer altas concentraciones de los derivados más peligrosos de los hidrocarburos [26].

El derrame de hidrocarburos en las diferentes fuentes hídricas es frecuente y regularmente no se controlan estos vertidos, ante el avance de la industria de los hidrocarburos se hace necesario contar con técnicas de análisis de este tipo de analitos en donde se destaca la cromatografía de gases con el fin de cualificarlos y cuantificarlos. Así se hace más factible analizar y emitir un juicio en cuanto a su impacto en el medio ambiente. En el siguiente capítulo se muestran diferentes técnicas muy importantes en este campo.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA EL ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS.

3.1 RESEÑA HISTORICA

La química analítica desde sus inicios, ha requerido de técnicas de separación para aislar los compuestos de interés objeto de estudio de una muestra, tanto para su cualificación como para su cuantificación. En el desarrollo de las diferentes técnicas de separación, surgieron los procedimientos en múltiples etapas y con ellas la cromatografía, nombre con el que se designan a varias técnicas de separación.

Estas técnicas cromatográficas se consideran iniciadas en el año 1834, con los trabajos realizados por Runge, F.F en la separación de mezclas de tinturas y extractos de plantas, usando tiras de papel. Goppelsroeder, F. en 1868, realizó separación de: tinturas, hidrocarburos, alcoholes, leche, cerveza, coloides, aguas, minerales y pigmentos de plantas y animales a través de análisis capilar utilizando tiras de papel [27].

En 1878 Schonbein, usó tiras de papel para el análisis de soluciones. Day, D.T. en 1897 analizó muestras de petróleo crudo en columnas empacadas finamente con tierra de fulleres (silicatos de aluminio y magnesio) haciendo pasar la muestra completamente mediante un flujo ascendente. En 1901 Tswett describió la absorción de pigmentos de plantas sobre proteínas y en 1906 explicó con detalle este método, dando sus principios y procedió a nombrar este proceso. Así, este investigador ruso se conoce como el padre de la cromatografía [28].

Para el análisis de hidrocarburos se han ido introduciendo diferentes métodos. Uno de ellos ha sido la determinación gravimétrica de sustancias lipófilas. Para ello se realiza una extracción con un disolvente volátil como éter de petróleo o n-hexano. A continuación, se evapora este disolvente y se determina el residuo mediante gravimetría. Así se pueden determinar hidrocarburos con puntos de ebullición medios y altos, pero también lípidos, grasas, ácidos húmicos y una gran variedad de otros compuestos orgánicos. La desventaja de este método es que no permite determinar compuestos volátiles.

Durante décadas, los métodos de referencia para la determinación de hidrocarburos de petróleo han sido los métodos fotométricos. Tras la extracción con un disolvente se mide la absorción, en el espectro de infrarrojos, de las oscilaciones características de los enlaces C-H (espectroscopia IR). Como parámetro suma se cuantifican dos o tres máximos de absorción característicos, de los cuales dos corresponden a hidrocarburos alifáticos y uno a aromáticos.

Las desviaciones producidas en el análisis de hidrocarburos aromáticos se han podido solventar, más tarde, con equipos más modernos. Esta tecnología permite la medición analítica de hidrocarburos con puntos de ebullición bajos, medios y altos.

En el método para el análisis de sustancias lipófilas, el disolvente también extrae productos similares a los analitos a determinar. Como desarrollo de este método se ha introducido un paso de limpieza mediante una columna cromatográfica con óxido de aluminio activado, que permite separar sustancias lipófilas, de tal forma que, en la determinación fotométrica, únicamente se detectan hidrocarburos procedentes de petróleo.

Para poder valorar los procesos de degradación biológica resulta útil la medición del extracto antes y después del paso de limpieza o (Clean Up) por la columna de óxido de aluminio. Un aumento en la diferencia entre los dos resultados indicaba una acumulación de productos lipófilos y productos intermedios de degradación.

La gran desventaja de este método que ya se había considerado como habitual en la química analítica ambiental y que había resultado muy fiable, es que solo se puede usar disolventes que a su vez no contienen moléculas con enlaces C-H. Por esta razón, los disolventes usados tienen que ser completamente halogenados (CFC's). En el marco del protocolo de Montreal para la protección de la capa de ozono se prohibió el uso de estos disolventes y por ello este método ya no se utiliza en los países industrializados modernos.

En algunos artículos de la década pasada se presenta el método de separación por fluorescencia de rayos ultravioleta para la determinación de hidrocarburos del petróleo. Uno de los artículos reporta que la mezcla de sustancias fluorescentes contenidos en aceites combustibles brutos y residuales se excita a 310 nm y emiten una fluorescencia más intensa en la proximidad de 360 nm. Esta técnica no es muy confiable y es difícil caracterizar los hidrocarburos por medio de esta [29].

También se conoce de algunos análisis organolépticos como es el caso de la técnica del olor incipiente, en donde catadores experimentados pueden decir si hay hidrocarburos presentes o no, y en algunos casos se muestra la identificación de diferentes hidrocarburos. Esta técnica permite identificar los hidrocarburos contaminantes, determinar su fuente y hacerles su seguimiento después de la intervención. Algunos artículos reportan esta técnica combinada con el método ultravioleta. La simplificación que realiza el método para abordar este tipo de contaminación permite su empleo en laboratorios químicos que cuenten con escasos recursos materiales, lo que hace posible su generalización a centros que cuenten con el equipamiento básico de laboratorio [16].

Así mismo se desarrollaron técnicas de cromatografía de gases para el análisis de contaminantes orgánicos. Se realiza una separación de las sustancias químicas contenidas en la muestra, a este proceso se le conoce como extracción. Actualmente, la extracción se realiza con disolventes no halogenados con punto de ebullición bajos y polaridad similar a los analitos de interés. El paso Clean-Up para la separación de otros productos lipófilos perturbadores se ha podido optimizar para conseguir preferentemente la detección de los hidrocarburos procedentes del petróleo (TPH's).

En el ámbito de los hidrocarburos volátiles, se ha introducido el método GC-head space en el análisis de las muestras se calienta el envase donde están los compuestos de interés volátiles. Estos se acumulan en fase gaseosa. Después de un tiempo, durante el cual se equilibra el sistema, se realiza el análisis directamente sobre la fase gaseosa. Para la caracterización de gasolina, mediante este método, se han establecido distintos rangos de análisis en los que se determinan los hidrocarburos aromáticos. También existen rangos de análisis para investigar hidrocarburos alifáticos (n-alcános homólogos).

En el caso de mezclas de hidrocarburos minerales, que pueden contener varios cientos y hasta miles de sustancias químicas distinguibles, la identificación resulta poco precisa. Por ello, ha sido un avance importante el poder acoplar un cromatógrafo de gases a un detector espectrométrico de masas para la identificación del analito (técnica GC-MS).

A raíz de la aplicación de la técnica GC-MS se han podido mejorar los métodos de análisis, en el ámbito de los compuestos volátiles. Paralelamente, por medio del desarrollo de los materiales de las columnas de separación, se ha mejorado la resolución en la caracterización de mezclas complejas y, en combinación con técnicas de derivación, se ha ampliado el rango de compuestos detectables e identificables a un gran número de grupos de sustancias [30].

3.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES

Todas las técnicas cromatográficas se fundamentan en principios físicos, exceptuando la cromatografía de intercambio iónico que se encuentra gobernada más por un principio químico que físico. En un sentido amplio la cromatografía designa procesos basados en diferencias de velocidades con las cuales los componentes individuales de una mezcla migran por un medio estacionario bajo la influencia de una fase móvil [28].

La cromatografía, en general es una técnica analítica de separación y con la cual, además se puede, cualificar y cuantificar los componentes de una mezcla.

La cromatografía de gases es la técnica a elegir para la separación de compuestos orgánicos e inorgánicos térmicamente estables y volátiles como los hidrocarburos alifáticos. La cromatografía gas-liquido lleva a cabo la separación por medio del reparto de los componentes de una mezcla química, entre una fase gaseosa que fluye (móvil) y una fase líquida estacionaria sujeta a un soporte sólido

Debido a su simplicidad, sensibilidad y efectividad para separar los componentes de mezclas, la cromatografía de gas es una de las herramientas más importantes en química. Es ampliamente usada para análisis cuantitativos y cualitativos, para la purificación de compuestos y para la determinación de constantes termoquímicas tales como calores de solución y vaporización, presión de vapor y coeficientes de actividad.

En la cromatografía de gases los componentes de una muestra vaporizada se separan como consecuencia del reparto entre una fase gaseosa y una fase estacionaria contenida en una columna. Al efectuar una separación cromatográfica de gases, la muestra se vaporiza y se inyecta en la cabeza de la columna. La elución se lleva a cabo mediante el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de la mayoría de las otras técnicas cromatográficas la fase móvil no interactúa con las moléculas de los compuestos a separar, su única función es transportar los compuestos a través de la columna.

Las aplicaciones de la cromatografía son múltiples y la convierten en una de las técnicas más importantes de análisis que existen [31].

La técnica más tratada para el análisis de hidrocarburos alifáticos es la de cromatografía de gases. Uno de estos estudios fue el realizado por parte de la Universidad de Concepción de Chile en donde se observó la presencia de una serie homologa de hidrocarburos alifáticos. Esta serie se caracterizó por una abundancia relativa mayor de los n-alcenos con número impar de carbonos [32].

En la siguiente sección se muestran diferentes aplicaciones de la cromatografía de gases enfocadas al análisis de hidrocarburos.

3.2.1 APLICACIONES

En la actualidad la cromatografía de gases es una técnica analítica usada en muchos laboratorios universitarios, de investigación e industriales, debido a su alta resolución, sensibilidad y selectividad.

Además de las aplicaciones típicamente analíticas, la cromatografía de gases puede utilizarse a escala preparativa para la obtención de compuestos de elevada pureza, así como también es posible la obtención de datos físico-químicos

relativos a propiedades superficiales, cinética y termodinámica de procesos de adsorción, separación, y desarrollo de catalizadores [33].

Esta técnica puede ser aplicada, principalmente en estudios de contaminantes del agua: insecticidas en agua, pesticidas en agua de lagos, lagunas, ríos; desechos industriales descargados en ríos y lagunas, vertimiento de hidrocarburos. En la industria del petróleo juega una función primordial, por medio de la cromatografía se pueden analizar los constituyentes de la gasolina, mezclas de gases de refinación, y gases de combustión. En el análisis de hidrocarburos totales y alifáticos juega un papel fundamental, especialmente cuando se requiere controlar estos analitos en matrices acuosas.

En algunos estudios realizados en refinerías Ecuatorianas basados en métodos EPA 8015 M fundamentado en cromatografía y extracción líquido-líquido se demuestra como aproximadamente el 70% de los efluentes no cumple con el decreto 1215 el cual corresponde al reglamento ambiental para las operaciones hidrocarburíferas en Ecuador, por existir valores de concentración mayores de 20mg/L [34].

También se documenta un estudio realizado en la zona costera de la ciudad de Antofagasta. En este análisis se determinó el contenido de hidrocarburos alifáticos totales e Hidrocarburos Aromáticos Totales. La separación y aislamiento selectivo de los hidrocarburos alifáticos y aromáticos totales se realizó mediante extracción líquido-líquido asistida por sonicación y cromatografía rápida sobre Silicagel [35].

3.2.1.1 ANÁLISIS CUALITATIVO

Los cromatogramas de gases se utilizan extensamente para determinar la pureza de compuestos orgánicos. La aparición de picos adicionales revela que hay contaminantes presentes y las áreas bajo estos picos proporcionan un cálculo aproximado del grado de contaminación. Dichas áreas son solo cálculos aproximados porque componentes diferentes podrían tener factores de respuesta del detector ampliamente distintos. Las técnicas de la cromatografía de gases también son útiles para evaluar la efectividad de los procedimientos de purificación.

En teoría los tiempos de retención de CG deberían servir para identificar los hidrocarburos alifáticos presentes en una mezcla. Sin embargo, la aplicabilidad de tales datos está limitada por el número de variables que debe controlarse para obtener resultados reproducibles. No obstante, la cromatografía de gases es un medio excelente para confirmar la presencia o ausencia de un supuesto hidrocarburo en una mezcla, siempre que se disponga de un patrón. Tras la

adición del compuesto conocido a la muestra, el cromatograma de esta no debe presentar ningún pico nuevo y debe observarse la intensificación de alguno de los picos ya existentes [31].

3.2.1.2 ANÁLISIS CUANTITATIVO

La altura del pico o el área bajo el pico de un producto de elución en una columna cromatográfica se utilizan ampliamente en los análisis cuantitativos. En condiciones muy bien controladas se puede alcanzar una exactitud (relativa) de 1% con el método del patrón externo o interno. Como con la mayoría de las técnicas analíticas, la confiabilidad se relaciona directamente con el control de las variables; la exactitud también depende en parte de la naturaleza de la muestra [36].

En los hidrocarburos alifáticos hay que tener un especial cuidado en las condiciones de temperatura para realizar la extracción ya que son bastante volátiles y esto podría disminuir la exactitud del método.

3.2.2 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES EN EL ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS

La cromatografía de gases es una de las técnicas más usadas, para análisis de hidrocarburos. Las ventajas que presenta, como alta sensibilidad, detección selectiva, elevada eficiencia en la separación, versatilidad, pequeño tamaño de muestra para efectuar el análisis y sencillez, son ampliamente reconocidas por toda la comunidad científica. Ninguna otra técnica analítica puede conseguir un poder de separación y sensibilidad equivalente para compuestos orgánicos volátiles [37].

Normalmente, el análisis por cromatografía de gases tarda unos minutos; muchas separaciones útiles se completan en 10 minutos. Con altas presiones se han terminado análisis completos en apenas unos segundos. Sin embargo, en la mayoría de los análisis de laboratorio este ahorro en tiempo no reduce apreciablemente el tiempo total involucrado en la toma de la muestra, el análisis cromatográfico y el cálculo de los resultados.

Una de las razones por la que se usa la cromatografía de gases en los análisis es la sensibilidad conseguida. El detector de conductividad térmica puede fácilmente medir microgramos. El detector de ionización de llama fácilmente mide nanogramos, y los detectores más selectivos como el de captura de electrones, y el detector fotométrico de llama alcanzan los picogramos.

Debido a esta sensibilidad, la cromatografía de gases es un método preferido para el análisis de trazas, particularmente de hidrocarburos, y demás contaminantes orgánicos del aire y del agua. La muestra requerida es mínima, para completar un análisis bastan unos microlitros. Otra ventaja de la cromatografía de gases es que permite obtener muy buenos resultados cuantitativos. Se puede obtener buena exactitud en una amplia gama de concentraciones de la muestra, desde miligramos hasta nanogramos.

Una de las limitaciones de la CG es que todas las muestras deben ser volátiles; de lo contrario, no pasaran a través de la columna. Con la CG es difícil tratar compuestos iónicos, compuestos de elevada polaridad, y compuestos de peso molecular muy alto. Otra desventaja es que el método cualitativo no es tan eficiente. Por lo general, para identificar la muestra se compara el tiempo de retención de patrones y muestras conocidas. Por tanto muchas veces es difícil confirmar la identidad de una muestra debido a que varios compuestos pueden tener tiempos de retención muy similares [36]. Estas desventajas no son gran inconveniente para el análisis de los hidrocarburos alifáticos ya que ellos son bastante volátiles, sus pesos moleculares no son grandes y tienen una polaridad baja.

3.2.3 INSTRUMENTACIÓN PARA LA CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)

La figura 4 muestra las partes básicas de un equipo de CG. El gas portador es almacenado a alta presión en un cilindro apropiado conectado al equipo mediante un regulador de presión. La muestra que contiene los hidrocarburos alifáticos se introduce en el sistema mediante jeringas, utilizando los inyectores. El inyector esta a una temperatura superior a la del punto de ebullición del disolvente de la muestra y normalmente, también superior al de los analitos; y es ahí donde se produce la necesaria volatilización.

La muestra se diluye con gas portador y solo una fracción de la misma entra en la columna capilar. Esta es la misión del divisor de muestra. En la columna se realiza la separación. Tras atravesar la columna, los analitos llegan a los detectores, donde se produce una señal eléctrica que es amplificada y enviada a un sistema de almacenado de datos para ser analizada [36].

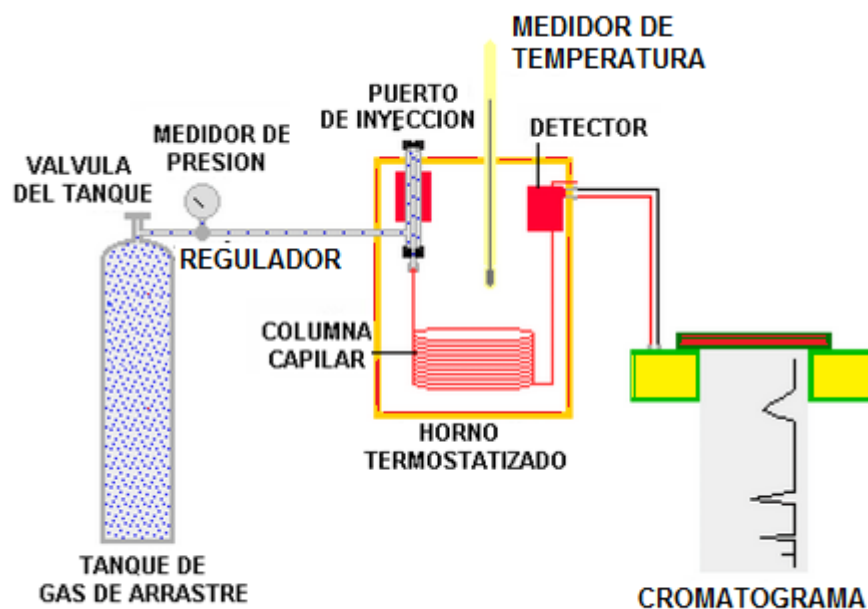


Figura 4. Diagrama de las partes básicas de un cromatógrafo de gases

3.2.3.1 GAS PORTADOR

La finalidad principal del gas portador es transportar los hidrocarburos alifáticos de la muestra a través de la columna. El gas deberá ser inerte y no reaccionar con los hidrocarburos, ni con la fase estacionaria, la selección del gas portador puede influir tanto en la separación como en la velocidad del análisis. Es importante que el gas portador sea de alta pureza. Las impurezas pueden alterar químicamente la fase, y por ende modificar los tiempos de retención.

El detector de ionización de llama usa helio o nitrógeno. El nitrógeno producirá más platos teóricos para una determinada longitud de columna, pero el análisis será mucho más lento. El helio producirá menos platos teóricos, pero el análisis será más rápido y es el gas recomendado para columnas largas.

La medición y el control del caudal del gas portador son esenciales tanto para la eficiencia de la columna como para el análisis cualitativo. Para medir la velocidad de flujo del gas de arrastre, se dispone en algunos equipos de un fluxómetro que suele ser del tipo rotámetro, constituido por un tubo de vidrio dispuesto verticalmente, de sección en forma de V, más amplia hacia la parte superior que

hacia la parte inferior, dentro de la cual hay una pequeña pieza metálica en forma cónica que es arrastrada por la corriente gaseosa [36].

3.2.3.2 SISTEMA DE INYECCIÓN DE MUESTRA

La introducción de la muestra donde esta presentes los hidrocarburos se hace mediante una microjeringa graduada en microlitros (1 microlitro = 10^{-6} litros, provista de una aguja hipodérmica con la cual se atraviesa un tapón de caucho. Al presionar el émbolo la muestra es depositada en una cámara de inyección, la muestra se puede introducir mediante válvulas, circuitos cerrados o en forma automatizada para minimizar errores en la cantidad inyectada.

El inyector es un pequeño recinto calentado eléctricamente y formado en material refractario que lo mantiene a una temperatura elevada, por lo cual la muestra se vaporiza inmediatamente, conectado en serie con el circuito del gas portador que se encuentra separado del exterior por un tapón de material perforable denominado septum el cual recupera su impermeabilidad inicial después de la perforación ocasionada por la aguja de la microjeringa, una vez esta ha sido retirada [36].

El modo estándar, adecuado para las aplicaciones de las columnas empacadas (o empaquetadas), es la inyección directa. La muestra es inyectada con una jeringa hipodérmica a través de un séptum de goma (o hule) de silicona autosellante, a un alineador de vidrio (glass insert) contenido en un bloque metálico, donde es vaporizada y barrida hacia la columna. El bloque se calienta a una temperatura que se fija en un valor suficientemente alto para convertir prácticamente en forma instantánea la muestra líquida en vapor. La cantidad de muestra inyectada es del orden de μL para líquidos y algo superior para gases

Cuando se trabaja con columnas capilares es necesaria una reducción del volumen de la muestra. Esto se logra mediante un inyector – divisor (inyección en split), donde generalmente se inyecta una muestra de 1 μL pero sólo entra al capilar 0.01 μL ; el resto es desechado. Esta técnica impide la sobrecarga de la columna, pero desperdicia una porción significativa de la muestra. Cuando se realizan análisis en cantidades pequeñas de muestra con algunos componentes en concentraciones del orden de milésimos de parte por millón, se introduciría muy poco material en la columna si para estas muestras se utiliza el divisor. Para ellas se requiere de solvente o inyección sin división (inyector en splitless).

En la mayoría de los trabajos de investigación para análisis de hidrocarburos se reporta la temperatura para el puerto de inyección entre 250°C y 290°C [38, 39,32].

3.2.3.3 COLUMNA Y HORNO DE LA COLUMNA

La columna efectúa la separación, siendo ésta el objetivo primario de la cromatografía de gases. El escoger la columna apropiada es una decisión importante y difícil en una buena técnica para cromatografía de gases. Dentro de ella se encuentra la fase estacionaria líquida dispuesta bien sea sobre un relleno sólido denominado soporte o sobre el lado interior de la pared.

El tubo de la columna puede ser de cobre, acero inoxidable, aluminio y vidrio tanto de forma recta como doblada o helicoidal. La de vidrio es la más recomendable para hidrocarburos. En general, se usan columnas de acero inoxidable, se rellenan enderezadas para obtener un relleno uniforme y se enrolla para facilitar el empleo de longitudes largas.

La longitud de la columna rellena varía desde 2 m hasta más de 20 m. Con mayores longitudes se obtienen más platos teóricos y mejor resolución. La velocidad del gas portador aumenta al pasar a través de una columna rellena y, así, solo un corto tramo de una columna larga funciona a velocidad óptima de flujo. Esto quiere decir que, con columnas extremadamente largas, el número de platos teóricos y la resolución obtenida muestran rendimientos decrecientes. Además, las columnas muy largas rellenas requieren presiones muy altas a la entrada [36].

El diámetro externo de las columnas capilares es de 0,15 cm y el diámetro interno de 0,025 a 0,05 cm. Para incrementar la capacidad de la columna hay que aumentar su diámetro. La eficiencia de la columna disminuye al aumentar el diámetro y la resolución es menor.

La columna se encuentra ubicada dentro de un horno o recinto termostataado, ya que la temperatura influye de modo importante en la retención de los componentes por la columna, y por tanto en la separación de los mismos; por ello, es importante que la temperatura sea constante a lo largo de toda la columna, por lo cual la temperatura debe ser fácilmente controlable [36].

Son diversos los casos en donde las condiciones de la columna para el análisis cromatográfico de los hidrocarburos son similares.

En algunos trabajos se muestra que se realizó la separación cromatográfica a través de una columna capilar de 30 m x 0.25 mm modelo DB-5 y SPB-5. El programa de calentamiento del horno fue: 70°C a 320°C, con una rampa de 6°C/min, y se mantiene 20 min [32, 38].

3.2.3.4. SISTEMA DE DETECCIÓN

El detector cromatográfico es un dispositivo que mide la concentración de cada uno de los componentes de la muestra y genera una señal eléctrica proporcional a dicha concentración. Los detectores son diversos, y constituyen una parte muy importante del cromatógrafo de gases.

Para seleccionar un buen detector se debe tener una sensibilidad adecuada junto con un bajo nivel de ruido, buena estabilidad y reproducibilidad, alta fiabilidad, manejo sencillo, y de volumen pequeño.

La sensibilidad es la cantidad de señal generada por unidad de concentración o por unidad de más de un analito en el gas transportador. Las unidades de sensibilidad se basan en la medida del área de los picos. Por otra parte el detector debe ser rápido, capaz de revelar casi instantáneamente variaciones de concentración en el gas portador que emerge de la columna cromatográfica; esta rapidez de respuesta es inherente a la naturaleza del detector, pero puede disminuir si el volumen interno del mismo es grande. Para obtener una buena información cuantitativa la respuesta del detector debe ser lineal y con un margen de linealidad lo más amplio posible [36].

3.2.3.4.1 DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA (FID)

El detector de ionización de llama es el que más se utiliza y por lo general uno de los que más se aplican en cromatografía de gases. El efluente de la columna se dirige a una pequeña llama de hidrogeno y aire. La mayoría de los compuestos orgánicos producen iones y electrones cuando se pirolizan a la temperatura de una llama de hidrogeno-aire. La detección implica controlar la corriente producida al recolectar estos portadores de carga. Cuando se aplica una diferencia de potencial de unos pocos cientos de volts entre el extremo del quemador y un electrodo colector situado por encima de la llama, los iones y los electrones se dirigen hacia el colector [31].

La llama de hidrogeno-aire genera un medio ionizante de gran eficacia para las sustancias orgánicas y, por tanto, un sensor que con los complementos electrónicos adecuados, constituye un transductor de elevada sensibilidad [36].

El detector FID funciona mediante la pirolisis del material que eluye de la columna en una llama de hidrogeno/aire con exceso de oxigeno. Cuando pasan por el detector los compuestos separados por la columna, estos reaccionan en la llama produciendo cationes. Los iones producidos son conducidos mediante un campo eléctrico hacia el colector, donde la corriente generada se amplifica para producir una respuesta [26].

El detector de ionización por llama manifiesta una elevada sensibilidad (10^{-13} g/s), un gran intervalo de respuesta lineal (10^7) y una bajo ruido. La desventaja de este detector son la destrucción de la muestra durante el paso de la combustión y la necesidad de gases adicionales y controladores [31].

El FID es un detector de muy alta sensibilidad apto para hidrocarburos pues permite detectar los iones de carbono que se forman durante la combustión a alta temperatura. Sumado a la alta sensibilidad, este detector presenta la característica de poseer un factor de respuesta (en masa) casi idéntico para todos los hidrocarburos: La misma masa de distintos componentes produce la misma intensidad de señal en el detector. Esta característica transforma al FID en un detector de mucha utilidad pues no es necesario conocer la fórmula de un componente para conocer su aporte a la masa total del sistema [40].

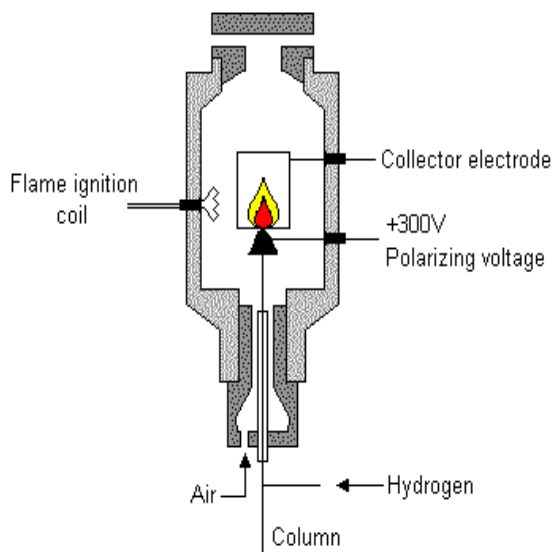


Figura 5. Detector de ionización de llama (FID) [41].

Debido a que este detector posee una alta sensibilidad especialmente para los hidrocarburos es el que se usa con mayor frecuencia en el análisis de estos, como es el caso de un trabajo realizado en la región Vasco-Cantábrica en España en donde se reporta un análisis de hidrocarburos alifáticos en muestras correspondientes a diferentes ambientes sedimentarios y diagenéticos. En este procedimiento la fracción de hidrocarburos saturados se inyectó en un cromatógrafo de gases equipado con detector de ionización de llama usando un sistema de inyección splitless (FID) [38].

También en Sudamérica se tiene reseña de varias investigaciones para determinar hidrocarburos en diferentes matrices, uno de estos trabajos realizados en Ecuador fue el análisis de Diesel fuel usando el método USEPA 8015 B el cual comprende extracción líquido-líquido y análisis por cromatografía de gases usando detector FID. Concluido este análisis los autores reportan un coeficiente de correlación de 0,989, desviación de repetibilidad y reproducibilidad de 0,23, el límite de detección de 457ppm, el límite de cuantificación de 541ppm, y el porcentaje de recuperación promedio del 88% [42].

3.2.3.4.2 DETECTOR DE CONDUCTIVIDAD TÉRMICA (TCD)

Este tipo de detectores, han sido de aplicación muy amplia en cromatografía de gases. Son detectores de una gran universalidad, buena linealidad, sensibilidad aceptable, para la mayoría de casos y de manejo relativamente simple.

Cuando un gas se mezcla con otra sustancia gaseosa, su conductividad térmica varía respecto a la que poseería cuando estaba puro. Por otra parte, al variar la temperatura de un filamento metálico o de un termistor, se cambia el valor de su resistencia.

El funcionamiento del detector de conductividad térmica se basa en el principio de que un cuerpo caliente perderá calor a una velocidad que depende de la composición del gas que lo rodea. Así, la velocidad de pérdida de calor puede usarse como una medida de la composición del gas [36].

Las ventajas del detector de conductividad térmica son su sencillez, su amplio intervalo lineal, su respuesta general tanto a especies orgánicas como a inorgánicas y su carácter no destructivo. Su limitación principal es su sensibilidad relativamente baja (10^{-8} g de soluto / mL de gas portador). Otros detectores son de 10^4 a 10^7 veces más sensibles [31].

3.2.4 EJEMPLO DE APLICACIÓN DESARROLLADO POR LOS AUTORES: ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO PARA HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS

A continuación se presenta el desarrollo experimental obtenido por los autores del presente documento en la estandarización de una técnica cromatográfica para análisis de hidrocarburos alifáticos.

Se usó un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (FID) marca Shimadzu GC-2014.

Autoinyector: AOC-20i+s
Automuestreador: AOC-20s
Inyección: Split-splitless
Columna: MXT5 serie 508529G1 (30m de longitud x 255 mm de ID x 0,50 µm de espesor de película)

A partir del estándar de hidrocarburos alifáticos marca RESTEK código de catalogo 31674 (certificado anexo 1) de concentración 12570 mg/L para cada hidrocarburo alifático se preparó un patrón de 40 mg/L utilizando como solvente de elución el pentano. Este se inyectó en el cromatógrafo de gases donde se realizó las diferentes corridas, y se hicieron diferentes variaciones de temperatura, columna, volumen de inyección y el flujo con el fin de obtener un procedimiento más eficiente

Las condiciones de operación que se lograron obtener para análisis de hidrocarburos alifáticos por parte de los autores del presente documento son las siguientes:

Columna: MXT5
Longitud: 30 m
Diámetro interno: 0.25 mm
Espesor de película: 0.5 µm
Gas transportador: Helio
Flujo total: 28 mL/min
Flujo en la columna: 1.29 mL/min
Velocidad lineal: 30.1 cm/s
Temperatura de inyector: 250°C
Volumen de inyección: 2 µL
Modo de inyección: Split
Radio de Split: 20,0
Temperatura del detector: 340°C
Tipo de detector: FID

Programa de temperatura:

40 °C, durante 2 min e incrementos de 20 °C/min hasta 150 °C y 20 °C/min a 300 °C durante 15 min.

En el cromatograma obtenido (Figura 6) se lograron identificar 17 picos, los cuales se presentan en la tabla 3.

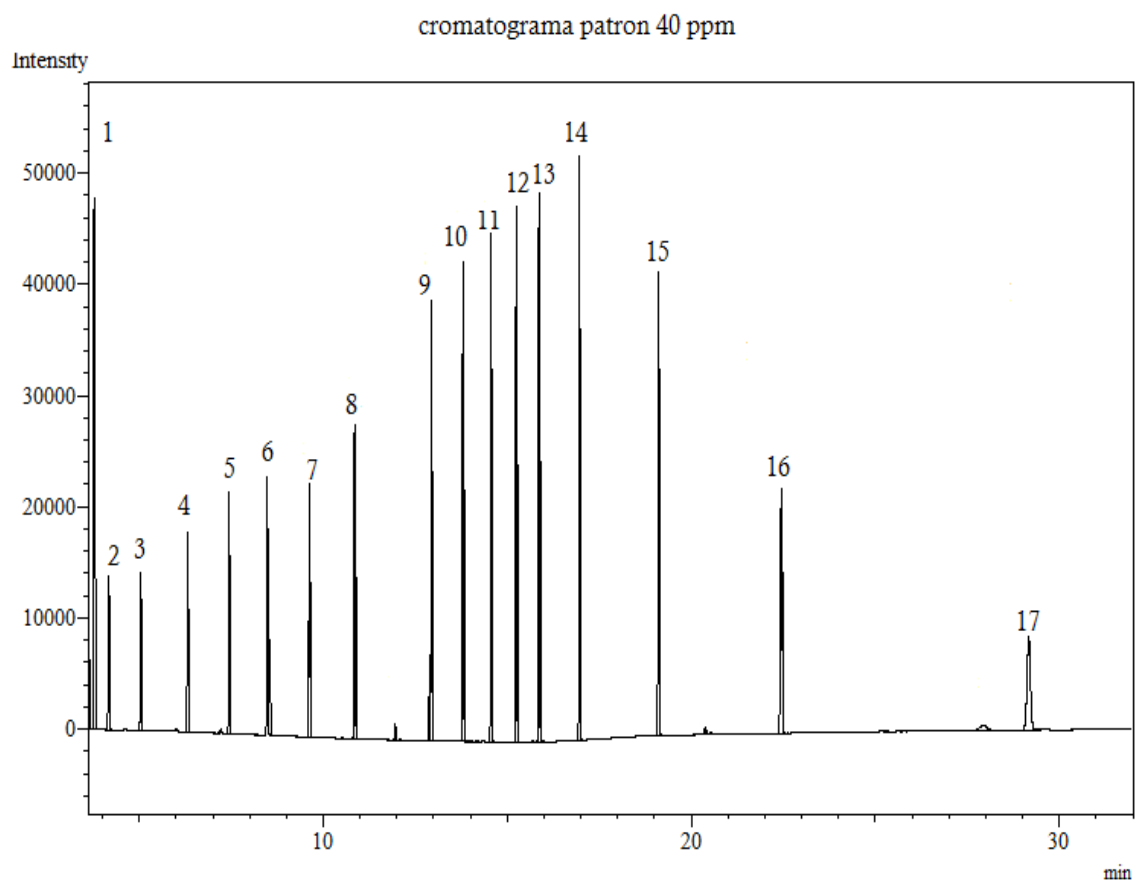


Figura 6. Cromatograma patrón 40 ppm hidrocarburos alifáticos

Pico	Compuesto	Tiempo de retención	Área
1	n-Hexano(C6)	3.784	156717
2	n-Heptano (C7)	4.173	31925
3	n-Octano (C8)	5.042	28480
4	n-Nonano (C9)	6.315	33302
5	n- Decano(C10)	7.440	37727
6	n-Undecano (C11)	8.477	33758
7	n-Dodecano (C12)	9.623	47831
8	n-Tetradecano (C14)	10.851	56341

9	n-Pentadecano (C15)	12.938	70923
10	n-Hexadecano (C16)	13.794	75902
11	n-Heptadecano (C17)	14.560	78646
12	n-Octadecano (C18)	15.243	81197
13	n-Eicosano (20)	15.860	82938
14	n-Tetracosano (C24)	16.960	87448
15	n-Octacosano (C28)	19.113	86518
16	n-Dotriacontano (C32)	22.447	72885
17	n-Hexatriacontano (C36)	29.172	53568

Tabla 3. Tiempos de retención y áreas medidas por el equipo, para hidrocarburos alifáticos (patrón 40 ppm)

En la figura 7 se muestra el cromatograma del solvente usado en la elución el cual es pentano.

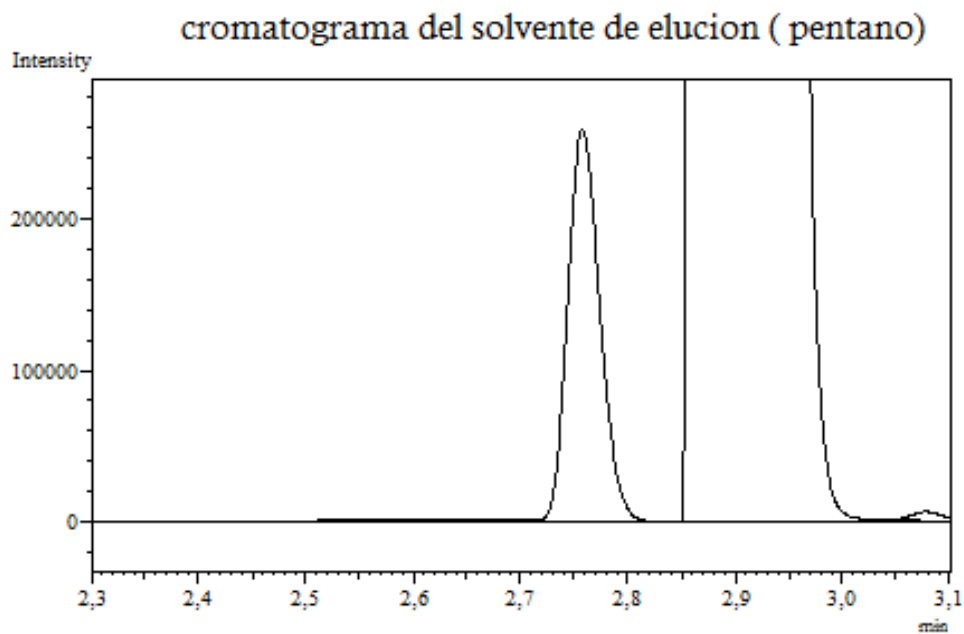


Figura 7. Cromatograma del solvente de elución (pentano)

3.2.4.1 PATRONES

Se propone el método del estándar externo para el análisis de hidrocarburos alifáticos en aguas residuales.

Se realizaron varias diluciones con el fin de obtener los respectivos patrones que abarquen las concentraciones desde 0,1 hasta 100 ppm. Este rango se dividió en 3 escalas: 0,1 -1 ppm, 1-10 ppm, y de 10-100 ppm, utilizando como solvente pentano y partiendo del estándar de hidrocarburos alifáticos 31674 RESTEK.

Luego de preparar los patrones, se procede a hacer el análisis en el cromatógrafo utilizando el método descrito en la sección **3.2.4**. Posterior a esto se obtienen los cromatogramas de los patrones y se representan las alturas o áreas de pico en función de la concentración.

En el anexo 2 se presentan los cromatogramas de los respectivos patrones de hidrocarburos alifáticos

Después de estandarizar el método se plantea realizar el siguiente procedimiento para el análisis de las muestras de aguas residuales.

Al finalizar la estandarización de la técnica se debe realizar la extracción de las muestras por medio de SPE como se describirá en el numeral **4.2**, luego se realiza el análisis cromatográfico a las mismas condiciones a las que se analizan los patrones externos. Se recomienda hacer la identificación de cada compuesto mediante comparación de tiempos de retención de los picos obtenidos en los cromatogramas de la muestra con los obtenidos en el estándar; y la cuantificación a partir de la curva de calibración obtenida al graficar el área del pico de cada patrón en función de la concentración. Las curvas de calibración se deben realizar por triplicado para comprobar la reproducibilidad del método.

3.2.5 CROMATOGRAFIA DE GASES/ ESPECTROMETRIA DE MASAS (CG/EM)

La combinación de la cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas se conoce por las siglas en inglés GC-MS y en español CG-EM. En la actualidad muchas compañías fabrican estos instrumentos con este potente sistema de detección

La técnica combinada de cromatografía de gases y espectrometría de masas permite realizar análisis rutinarios de mezclas de compuestos, como las mezclas que se obtienen en las reacciones o las muestras que se recogen en el medioambiente, como los hidrocarburos alifáticos.

El cromatógrafo de gases utiliza una columna capilar incluida en un horno termostático. Esta columna está revestida en su interior con gel de sílice (u otra fase estacionaria), cuya diferente interacción con las sustancias de la mezcla permite separar los componentes de la misma. Se inyecta una pequeña cantidad de muestra en un inyector calentado que permite la volatilización de la muestra. Los componentes volátiles son empujados, entonces, a lo largo de la columna por una corriente capilar de helio. A medida que la muestra pasa a través de la columna, los componentes más volátiles (o bien que interaccionan menos con la fase estacionaria) se mueven más rápidamente a través de la columna que los componentes menos volátiles. Los componentes, separados, abandonan la columna a tiempos diferentes, pasando mediante un conducto de transferencia a la fuente de iones del espectrómetro de masas, donde las moléculas se ionizan y se fragmentan [8].

En CG-EM, los solutos que eluyen de la columna pasan directamente a la cámara de ionización de un espectrómetro de masas, de forma tal que la mayor parte del gas portador se elimina. En la cámara de ionización todas las moléculas, (resto del gas portador, disolvente y solutos) se ionizan y los iones se separan según su relación masa-carga. Como cada soluto sufre una fragmentación característica a iones más pequeños, su espectro de masas de intensidad de ion en función de la relación masa-carga proporciona información cualitativa que puede utilizarse para identificar el soluto [31].

Esta poderosa combinación CG-EM permite que el cromatógrafo de gases separe los componentes de la mezcla y que posteriormente sean identificados por su espectro de masas [43].

Al hacer el análisis usando GC-EM se sabe con más certeza cuáles son los hidrocarburos de interés, es por esto que los laboratorios han ido involucrando esta técnica en sus análisis, como es el caso de un estudio realizado en la Universidad central de Venezuela en donde se hizo un análisis geoquímico de crudos provenientes del estado Apure. Se determinó la concentración de las fracciones constituyentes de las muestras (hidrocarburos saturados, hidrocarburos aromáticos, resinas y asfáltenos). Una vez separadas las fracciones se determinó la distribución de las fracciones de hidrocarburos saturados por cromatografía de gases y la distribución de compuestos aromáticos, correspondiente a compuestos fenantrenos, metil-fenantrenos, y metil-dibenzotiofeno por espectrometría de masas.

Las fracciones de hidrocarburos saturados y aromáticos fueron analizadas en un equipo CG-MS Perkin-Elmer, modelo Qmass-910 equipado con una columna capilar del tipo SE-52, de 30 m de largo y 0,25 mm de diámetro interno. Las muestras fueron analizadas por el método selección de iones monitoreados (SIM) y para ello se escogieron los iones con las relaciones $m/z = 191$, 217 y $m/z = 178$,

192 y 198 para las fracciones de hidrocarburos saturados y aromáticos respectivamente. Los parámetros de, cromatografía y masas empleados fueron las siguientes: temperatura inicial de 80 °C a una velocidad de calentamiento de 4 °C/min hasta 180 °C, con una temperatura del inyector de 270 °C [44].

3.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS MOLECULAR (EM)

3.3.1 CONSIDERACIONES TEÓRICAS

De todas las herramientas analíticas de que dispone un científico, la espectrometría de masas es quizás la de mayor aplicación, en el sentido de que esta técnica es capaz de proporcionar información acerca de: la composición elemental de las muestras; la estructura de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas; de la composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas y de las relaciones isotópicas de átomos en las muestras [37].

Como muchas reacciones químicas usadas para análisis, el propósito básico de la Espectrometría de masas es convertir la muestra en productos que son indicativos de la molécula original. Los productos formados son bastante raros: iones positivos gaseosos, cuya masa y abundancias relativas son mostrados en el espectro de masa [33].

IMPACTO ELECTRÓNICO (IE)

Para este método de ionización, el “reactivo” que produce los productos iónicos es un haz de electrones energéticos. Estos son calentados en un filamento incandescente, y viajan a través de la cámara de iones hasta un ánodo (trampa de iones) en el lado opuesto. El flujo de moléculas vaporizadas de la muestra a una presión de aproximadamente 10^{-3} Pa (10^{-5} torr) que entra a la fuente interactúa con el flujo de iones para formar una variedad de productos, incluyendo los iones positivos. Con la IE se pueden introducir muestras de moléculas largas usando la técnica de haz de partículas [33].

IÓN MOLECULAR.

El ión molecular M^+ provee la más importante información en el espectro de masa. Desafortunadamente, para algunos tipos de compuestos el ión molecular no es lo suficientemente estable para ser encontrado con apreciable abundancia en el espectro de IE. Para estos casos la espectrometría de masas proporciona la técnica de ionización química. Los siguientes son requerimientos necesarios pero

no suficientes para el ión molecular en un espectro de masas: Debe ser el ión con mayor masa en el espectro; debe ser una especie radical, que contenga un electrón desapareado; debe ser capaz de producir los iones importantes en la región de masas alta del espectro por pérdidas de especies neutras lógicas [33].

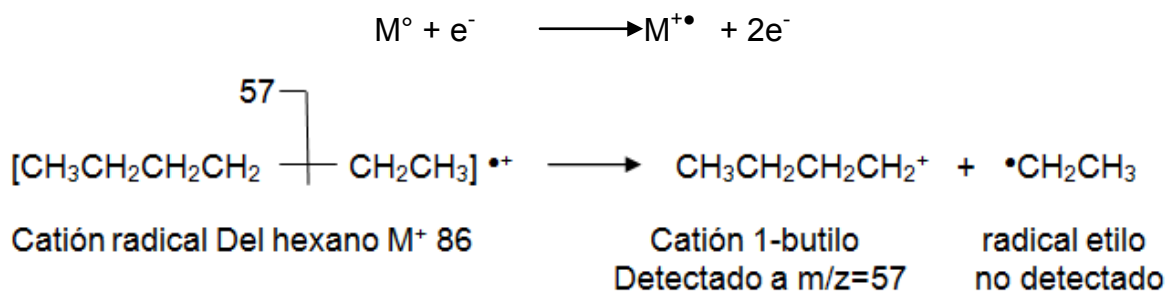
3.3.2 APLICACIONES

ANÁLISIS CUALITATIVO: IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS PUROS

El espectro de masas de un compuesto puro proporciona diversos tipos de datos que son útiles para su identificación. El primero es el peso molecular del compuesto y el segundo es su fórmula. Además, el estudio de los modelos de fragmentación que se pone de manifiesto en el espectro de masas a menudo proporciona información sobre la presencia de varios grupos funcionales. Finalmente, la identidad real de un compuesto puede establecerse a menudo por comparación de su espectro de masas con los de compuestos conocidos hasta llegar a una total coincidencia [45].

3.3.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LOS HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS

El espectro de masas del n-hexano (figura 8) presenta varias características de los alcanos de cadena lineal. El pico base ($m/z=57$) corresponde a la pérdida de grupo etilo, formándose un radical etilo y un catión butilo. El radical etilo neutro no se detecta, ya que no está cargado, y no es acelerado o desviado por los campos magnético y eléctrico.



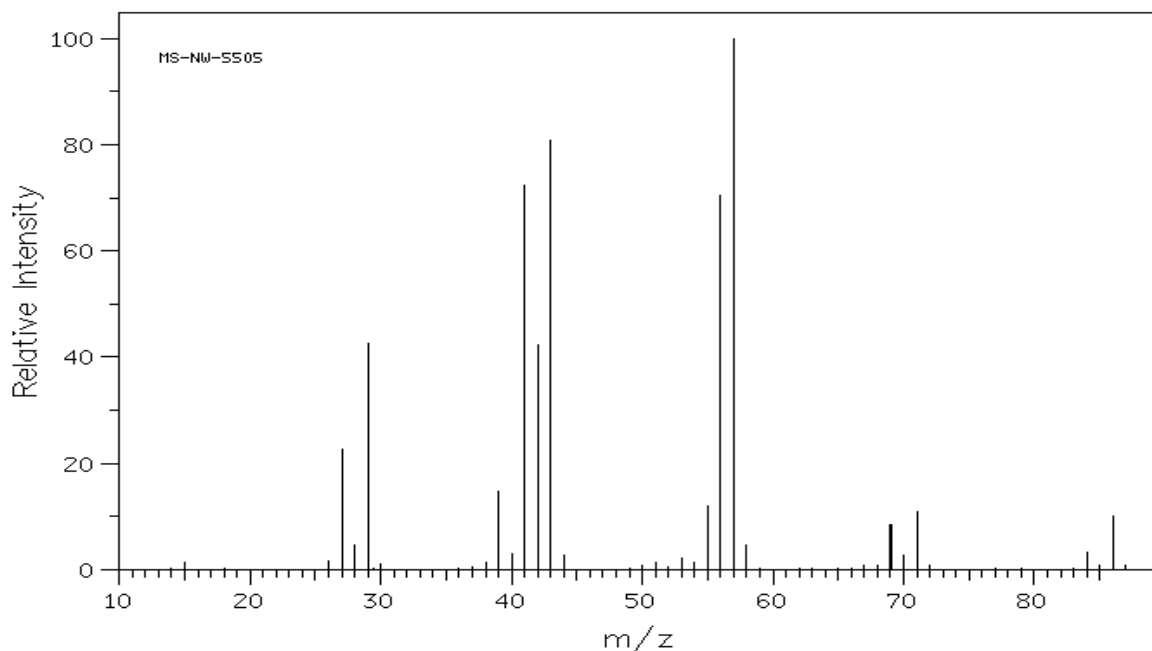


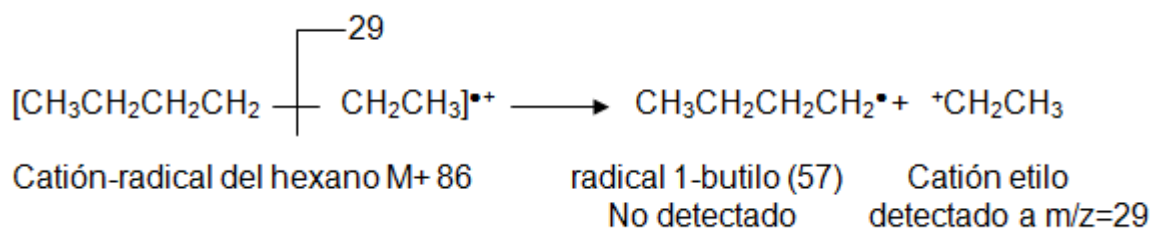
Figura 8. Espectro de masas del n-hexano [46].

Relación m/z	Intensidad relativa
15	1.3
26	1.7
27	22.7
28	4.7
29	42.5
30	1.0
38	1.2
39	14.8
40	3.1
41	72.5
42	42.4
43	80.9
44	2.8
51	1.2
53	2.2
54	1.2
55	12.1
56	70.5

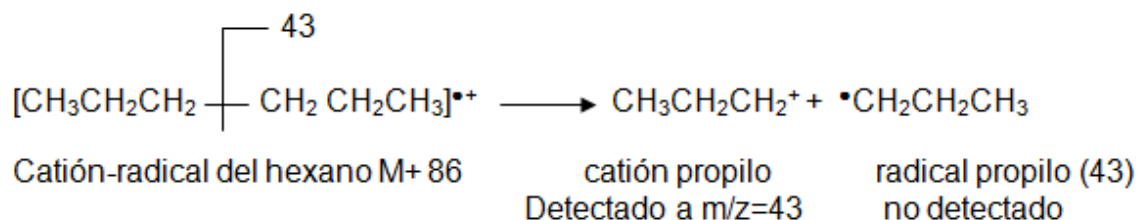
57	100.0
58	4.7
69	8.5
60	2.6
71	11.0
84	3.2
86	10.0

Tabla 4. Relación m/z e Intensidad relativa de los picos mostrados en la figura 8 para el espectro de masas del hexano.

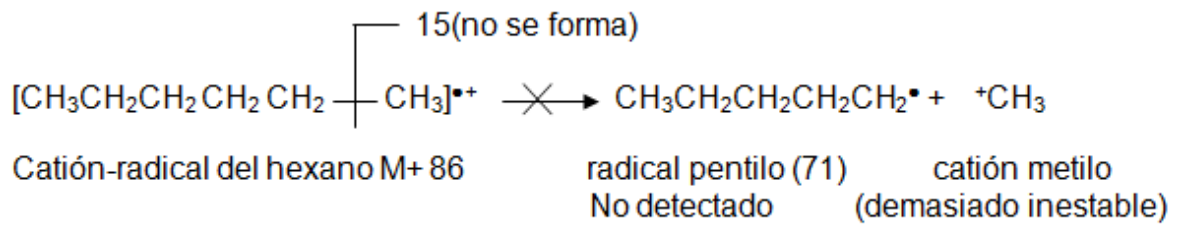
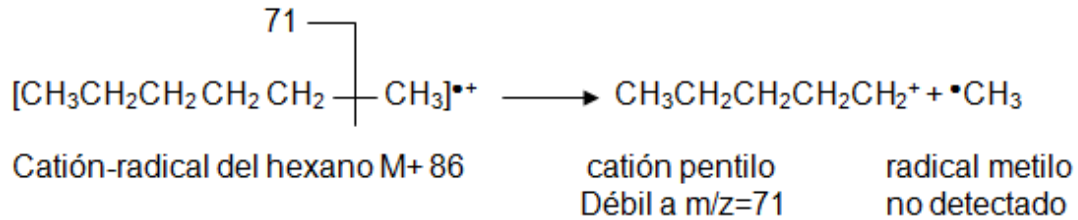
Una fragmentación similar da lugar a un catión etilo y a un radical butilo. En este caso, se detecta el fragmento etil ($m/z=29$)



La ruptura simétrica del hexano da lugar a catión propilo y a radical propilo



La ruptura para dar lugar al catión pentilo ($m/z = 71$) y al radical metilo es débil porque el radical metilo es menos estable que un radical sustituido. La ruptura para dar lugar a un catión metilo ($m/z=15$) y a un radical pentilo no es visible porque el catión metilo es menos estable que un catión sustituido. La estabilidad del catión aparentemente es más importante que la estabilidad del radical, ya que aparece un pico débil que corresponde a la pérdida de un radical metilo (con formación de un radical pentilo), pero no se observa la ruptura que da lugar al catión metilo [8].



Regularmente las muestras que se reciben en un laboratorio no están en la forma apta para realizar directamente un análisis. Muchas veces la muestra no está en el disolvente apropiado. La técnica de cromatografía de gases requiere que la muestra este en un disolvente volátil, poco tóxico y soluble en el analito. Es allí donde se procede a usar una técnica de extracción, en la cual se transfiere el soluto de cierto disolvente a otro que sea adecuado. Es por esto que en el capítulo 4 se estudiara las diferentes técnicas de preparación previas para el análisis de hidrocarburos usando cromatografía de gases.

CAPÍTULO 4

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

4.1 RECOLECCIÓN Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

Los daños ambientales causados por el ser humano conllevan considerables daños materiales y costes económicos, así como afecciones a los medios de protección suelo, agua y aire. Ello implica un riesgo para el cuerpo, la vida y la salud de las personas, la fauna y la flora y supone una hipoteca para futuras generaciones.

Debido al amplio rango de aplicación de los hidrocarburos, los daños medioambientales causados por éstos tienen un papel importante. El primer paso para verificar la existencia de contaminantes orgánicos es la obtención de una muestra representativa. Los errores cometidos en la toma de muestra no se pueden subsanar ni con los mejores métodos analíticos.

Para conservar las muestras después de su extracción, son especialmente aptos recipientes de material inerte como es el cristal. Idóneamente deben ser de reciente fabricación y con cierre hermético. Las muestras de aguas deben estabilizarse en el mismo emplazamiento para evitar que sufran alguna alteración hasta que se analicen. Las muestras deben conservarse y transportarse en frío y oscuridad. Bajo estas Condiciones, las pérdidas en muestras con un contenido de aproximadamente 1.000 mg/kg de hidrocarburos– son inferiores al 1% [30].

Para tener un buen tratamiento de la muestra es necesario recurrir a métodos ya establecidos que garanticen un porcentaje de error muy bajo. Sin embargo para los hidrocarburos alifáticos no existe un método particular, por eso es necesario recurrir a la busca de métodos para hidrocarburos totales y sustancias orgánicas volátiles.

El método 5035 de EPA en conjunto con el método 8015 (GC/FID) puede ser usado para el análisis de hidrocarburos alifáticos en fracciones ligeras de hidrocarburos totales como en la gasolina. Para un análisis total de las fracciones presentes en la gasolina se pueden usar los métodos 8021 y 8015. El método 8260b es usado para el análisis de compuestos orgánicos volátiles por medio de cromatografía de gases con detector FID. Estos métodos pueden ser útiles pero no definitivos si se desea estandarizar la técnica para el análisis de hidrocarburos alifáticos por cromatografía de gases con detector FID.

4.2 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

4.2.1 CONSIDERACIONES TEÓRICAS

La técnica de extracción en fase sólida es una de las técnicas más ampliamente utilizadas en la preparación de muestras para análisis por medio de técnicas cromatográficas, electroforesis y hasta en espectrofotometría. Es esencialmente una técnica de separación basada en los mismos principios de la cromatografía líquida, con un poder de resolución menor, pero con buena selectividad.

En SPE se hace pasar una disolución que contiene los analitos de interés como los hidrocarburos alifáticos sobre una fase sólida (o fase estacionaria) que los absorbe específicamente, la cual suele estar compactada en el fondo de una pequeña columna de plástico. Después de la adsorción, los hidrocarburos se eluyen con una pequeña cantidad de otro disolvente extractor, con el que interactúan más fuertemente que con la fase estacionaria. Por tanto, la SPE no solo consigue un cambio de matriz del analito, sino que reduce el volumen de la muestra [26,27].

Por sus características de versatilidad en cuanto al tamaño de la muestra, desde el orden de los gramos hasta los picogramos (pg), permite separaciones tanto a escala preparativa como analítica; por la gran diversidad de sustancias que pueden separarse, desde compuestos orgánicos en todo el rango de pesos moleculares y polaridades hasta compuestos o iones inorgánicos; y por su capacidad de acoplamiento con varios sistemas de detección tanto universales como selectivos y específicos; la cromatografía se ha convertido en la técnica más ampliamente usada en los laboratorios.

Dadas las características anteriores que se presentan en los sistemas cromatográficos, especialmente los analíticos; se hace necesario disponer de un sistema de preparación de las muestras que permita cumplir con los siguientes objetivos:

- Minimizar la complejidad de la matriz que contiene los hidrocarburos alifáticos, eliminando el mayor número posible de sustancias que pueden interferir en el sistema cromatográfico seleccionado.
- Recuperar eficiente y reproduciblemente los componentes que se desean analizar en este caso los hidrocarburos, permitiendo su concentración o disolución en un solvente adecuado para la inyección en el sistema cromatográfico escogido.
- Prevenir los posibles daños en cada uno de los componentes del instrumento y especialmente de la columna cromatográfica

- Disminuir el tiempo de análisis y limpieza de la columna después de cada desarrollo cromatográfico.

Para cumplir con estos objetivos se han ideado diversas técnicas, entre estas la extracción en fase sólida (SPE), debido a que cumple muy de cerca con los objetivos propuestos anteriormente a un bajo costo y con la versatilidad de la cromatografía líquida.

En cualquier sistema de extracción en fase sólida se cuentan con tres componentes:

- La muestra problema que contiene los analitos en una matriz problema
- La fase estacionaria o soporte sólido (cartucho)
- Los solventes de acondicionamiento, lavado y elución.

Los componentes de la muestra se separan por migración diferencial desde la fase estacionaria hacia los solventes de lavado y elución, atendiendo a la diferencia en cuanto a propiedades físicas o químicas, las cuales favorecen las fuerzas de retención para algunos compuestos y las fuerzas de elución para otros.

La retención de los analitos en los cartuchos de extracción en fase sólida se realiza mediante diversos mecanismos. Los más usados son: adsorción, partición en fase ligada normal e inversa, intercambio iónico, apareamiento iónico, exclusión molecular y filtración en gel.

La mayoría de las fases estacionarias utilizadas para extracciones en fase sólida son de silica-gel o modificaciones de esta con tamaños de partícula y promedio de 40 micrómetros y tamaños de poro por lo general de 60 angstroms, exceptuando aquellas usadas en las separaciones por tamaño molecular [47].

La extracción en fase sólida se usa primordialmente para preparar muestras líquidas y extraer analitos semivolátiles. Los usos más importantes de la SPE en matrices acuosas son plaguicidas, hidrocarburos alifáticos, benceno, materiales aromáticos policíclicos, fenoles clorinados, bifenilos policlorinados, cloroanilinas y cloruro de tributilestaño [47].

Los principales objetivos de la SPE son: a) eliminación de componentes que interfieren con la matriz, b) concentración selectiva y aislamiento de los analitos, y c) cambio de la matriz del analito según sea necesario para su posterior análisis.

Las diferentes fases estacionarias se clasifican según el tipo de interacción que tengan con el analito. Las interacciones son consecuencias de sus propiedades químicas y básicamente son tres tipos: interacciones polares, interacciones no

polares e interacciones de intercambio iónico. Esta última clase se subdivide en intercambio aniónico e intercambio catiónico.

4.2.2 INTERACCIONES POLARES

Las interacciones polares que se dan en la SPE incluyen puente de hidrogeno, interacciones dipolo-dipolo y otras interacciones entre átomos del analito y los grupos polares de la fase estacionaria. La retención de analitos por interacciones polares se facilita mediante disolventes polares con alta fuerza iónica. Este mecanismo de interacción se denomina partición en fase normal [35]

Los adsorbentes polares más comúnmente utilizados para fase normal SPE son sílice (SiO_2)X, alúmina (Al_2O_3), silicato de magnesio (MgSiO_3 o Florisil), y los adsorbentes de sílice enlazada en los que la sílice reacciona con grupos funcionales altamente polares para producir aminopropil [$(\text{SiO}_2)\text{X}-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$]-, cianopropil [$(\text{SiO}_2)\text{X}-(\text{CH}_2)_3\text{CN}$]-, y diol [$(\text{SiO}_2)\text{X}-(\text{CH}_2)_3\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2(\text{OH})$]-. [48].

En la figura 9 se muestran algunos ejemplos de fases estacionarias apolares, y sus interacciones con los hidrocarburos alifáticos. [48]

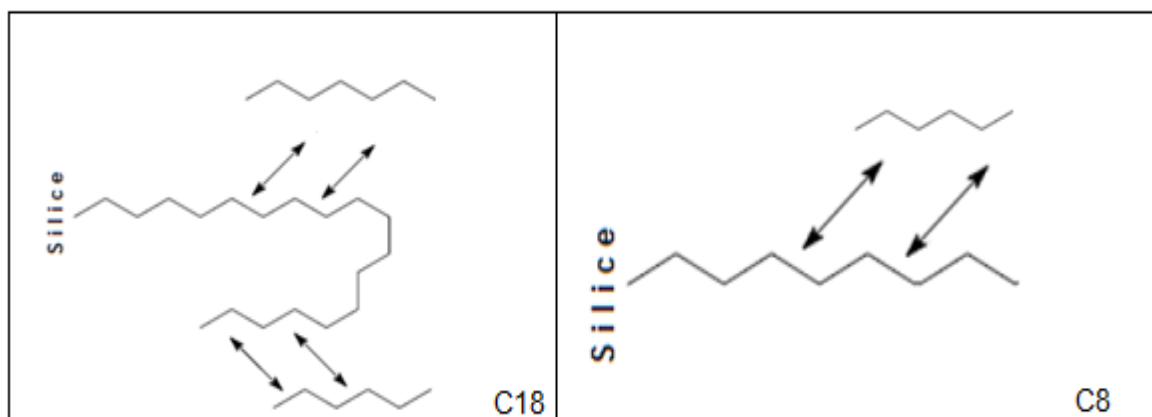


Figura 9. Fases estacionarias apolares, y sus interacciones con los hidrocarburos alifáticos.

4.2.3 INTERACCIONES APOLARES

Las interacciones no polares son aquellas que ocurren entre los enlaces carbono-hidrogeno del adsorbente y los enlaces carbono-hidrogeno de los analitos. La retención de analitos por interacciones no polares se facilita por disolventes polares. La elución de analitos desde adsorbentes no polares se facilita con

disolventes con suficiente carácter apolar como para romper las interacciones no polares entre analito y adsorbente. Este mecanismo de retención se denomina partición en fase reversa [26].

Las fases enlazadas comunes producidas para aplicaciones en fase reversa incluyen grupos hidrofóbicos y alquilo alifáticos como octadecil (C18), octil(C8), etil (C2) o ciclohexil unidos covalentemente a la columna vertebral de la sílica gel [48].

La mayoría de las fases estacionarias utilizadas para SPE son de sílica gel o modificaciones de ésta con tamaño y partículas en promedio de 40 μm y tamaños de polo por lo general de 60 Å, exceptuando aquellas usadas en las separaciones por tamaño molecular [49]. Las columnas para extracción en fase sólida tienen capacidad de depósito de 1mL, 3mL y 6 mL, pero pueden ser adaptados depósitos de 15 mL ó 75 mL cuando el volumen de la muestra es muy grande [50].

En la tabla 5 se muestran fases estacionarias usadas para extracción en fase sólida.

Cod.	Estructura	Mecanismo de retención-elución
Si	Silicagel (Polar)	Fase normal
Florisil	Silicato de Magnesio Polar	Fase normal
Diol	-(CH ₂) ₃ -O-CHOHCH ₂ OH	Fase normal
NH ₂	-(CH ₂) ₃ -NH ₂ Aminopropil	Fase normal
Al-A	Alúmina acida	Fase normal
Al-B	Alúmina básica	Fase normal
Al-N	Alúmina neutra	Fase normal
CN	-(CH ₂) ₃ -CN Cianopropil	Fase normal/inversa
C-8	-(CH ₂) ₇ -CH ₃ Octil	Fase inversa
C-18	-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃ Octadecil	Fase inversa
Ph	-(CH ₂) ₃ -Phe fenilpropil	Fase inversa
NH/NH ₂	-(CH ₂) ₃ NHCH ₂ CH ₂ NH ₂ Diamino (WAX)	Intercambio aniónico (Débil)
SAX	-(CH ₂) ₃ N ⁺ (CH ₃) ₃ Cl ⁻	Intercambio aniónico F
SCX	-C ₆ H ₄ -SO ₂ OH (Fuerte)	Intercambio catiónico
WCX	-(CH ₂) ₃ -COOH (Debil)	Intercambio catiónico
G-25	Sephadex G-25	Exclusión
LC-PCN	Cianopropil silil	Exclusión

Tabla 5. Fases estacionarias usadas para extracción en fase sólida

4.2.4 VENTAJAS DE LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

- Bajo consumo de disolvente.
- El tamaño de muestra puede ser grande o pequeño.
- Ahorro de tiempo y costos.
- A menudo una preparación de la muestra se puede resolver más concretamente mediante el uso de SPE, ya que es posible diferentes interacciones del analito con la fase sólida (absorbente), y los métodos pueden ser optimizados mediante el ajuste de las condiciones cromatográficas. La SPE ofrece una multitud de adsorbentes polares, hidrofóbicos y o interacciones iónicas, mientras que la extracción líquido-líquido se limita a la partición de equilibrios en la fase líquida [48].

4.2.5 REQUERIMIENTOS INSTRUMENTALES

El componente instrumental más importante en extracción en fase sólida es el cartucho; sin embargo, para facilitar la realización de las cinco etapas del proceso, la de acondicionamiento de la fase estacionaria, la aplicación de la muestra, la de lavado, el secado y finalmente la elución, se requieren otros accesorios que agilicen el paso de los solventes y la muestra a través del soporte, de una manera rápida, eficiente y reproducible.

La primera opción es la utilización de una jeringa para empujar los solventes de acondicionamiento, de lavado, aplicar la muestra, secar y finalmente eluir los analitos. La jeringa debe ser resistente al ataque químico en todas sus partes con el fin de evitar contaminación. Es preferible hacer el acondicionamiento y la aplicación de la muestra por gravedad, mientras el lavado, secado y la elución se realizan generando alguna presión sobre la jeringa o mecanismo usado.

Este procedimiento es adecuado si se controla la velocidad de flujo, pero puede presentar problemas cuando cambian las proporciones de los solventes de lavado o de elución entre muestra y muestra como consecuencia de evaporación.

El segundo procedimiento es similar al anterior, pero en lugar de jeringa, los solventes y la muestra se impulsan con aire o nitrógeno. Este sistema es más eficiente en cuanto al control de flujo y especialmente en el secado de muestras que contienen analitos sensibles al oxígeno.

Otra alternativa es un tercer procedimiento, en el cual, los solventes se impulsan a través del cartucho por succión usando una bomba de vacío. Este procedimiento

es adecuado si se regula el flujo, pero es inconveniente cuando el número de muestras es alto [27].

Actualmente una de las técnicas más adecuadas para gran número de muestras o réplicas, es el sistema múltiple de vacío (vacuum manifold) que se presenta en la figura 10.

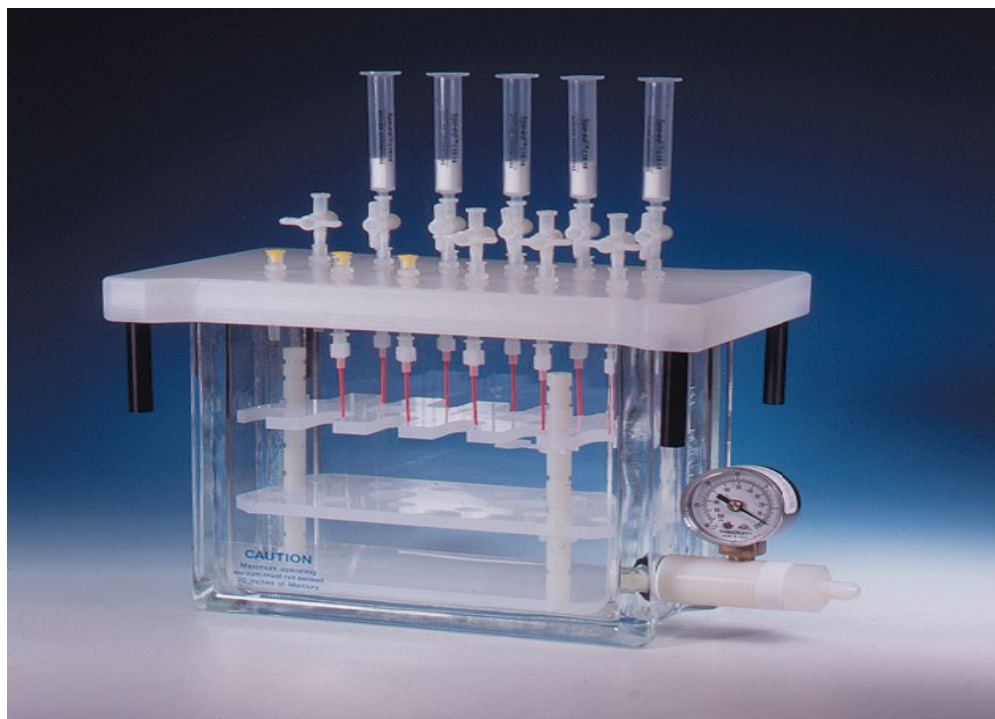


Figura 10. Sistema Vacuum manifold para SPE [51].

Este sistema ayuda a tener una filtración constante y resultados óptimos. El analista puede ahorrar tiempo, ya que permite el procesamiento de muestras múltiples. Los filtros no deben ser conectados al puerto colector de vacío antes de la elución. El procesamiento en paralelo con este tipo de sistema reduce enormemente el tiempo en la preparación de muestras.

El sistema Vacuum manifold, también conocido como sistema de vacío múltiple para extracción en fase sólida, consta de un recipiente de vidrio de paredes gruesas, equipado con un medidor de vacío y una válvula de regulación la cual permite reproducir la velocidad de flujo de la muestra, lavados y elución. Dentro del recipiente se colocan las gradillas resistentes al ataque químico, las cuales vienen para sostener tubos de ensayo de diferentes tamaños, viales o frascos volumétricos. La cubierta del extractor está provista de válvulas de control de flujo ajustables individualmente, empaque de la cubierta resistente al ataque químico,

agujas removibles en acero inoxidable para guiar el solvente. Los cartuchos se ensamblan en las válvulas de control de flujos [51].

Cuando se requiere la aplicación de volúmenes grandes de muestra se acoplan los adaptadores para montar encima el reservorio de muestra. Estos adaptadores también se usan cuando se van a secar las muestras con corriente de nitrógeno o aire, utilizando el sistema de secado. Este sistema está provisto de perillas de ajuste individuales.

En el proceso de extracción, es necesario acondicionar la fase estacionaria, haciendo pasar de 2 a 4 porciones de 0,1 a 1mL del solvente de acondicionamiento, teniendo la precaución de no dejar secar la columna entre porción y porción. Luego viene la aplicación de la muestra y el lavado, lo cual puede realizarse dejándola pasar a través de la fase estacionaria a presión atmosférica o bien por succión o impulsando con corriente de aire o nitrógeno controlando la velocidad de flujo. Generalmente es necesario secar la columna durante 10-15 minutos antes de la elución [27].

4.2.6 PROCEDIMIENTO GENERAL EN EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

ETAPA DE ACONDICIONAMIENTO

La activación del adsorbente y de los grupos funcionales se consigue al pasar un volumen de solvente o mezcla de solventes apropiado a través de la columna. Los discos de la columna se solvatan convenientemente. Para activar adsorbentes hidrofóbicos se usa generalmente metanol o acetonitrilo, mientras que para los hidrofílicos se usa hexano o cloruro de metileno. Se recomienda usar de 2 a 4 volúmenes de solvente [52].



Figura 11. Etapa de acondicionamiento SPE

ETAPA DE CARGA DE MUESTRA

Aplicar la muestra en la parte superior del lecho de adsorbente. Los contaminantes de matriz pueden pasar por la columna sin ser retenidos, y otros componentes de la matriz pueden retenerse más o menos fuertemente en la superficie del adsorbente. Para obtener la máxima eficacia se debe controlar el caudal de la muestra. Si se desea incrementar el caudal de una muestra viscosa se pueden usar adsorbentes de 90 o 140mm. La capacidad de intercambio y la selectividad no se ven afectadas (conviene analizar la fracción no retenida para comprobar que todos los compuestos de interés han sido retenidos) [52].

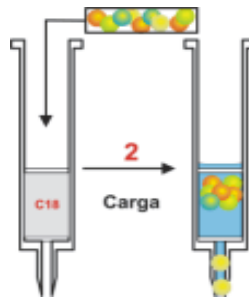


Figura 12. Etapa de carga de muestra SPE

ETAPA DE LAVADO

El lavado permite la eliminación de cualquier resto de compuestos que puedan interferir manteniendo los analitos en el lecho de adsorbente. Se pueden usar solventes o mezcla de solventes de diferente tipo para mejorar la eficacia del lavado [52].

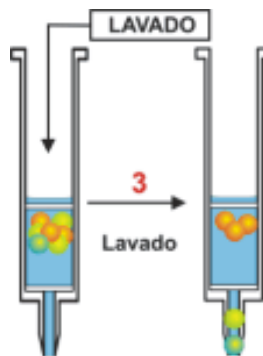


Figura 13. Etapa de lavado SPE

ETAPA DE SECADO

Las trazas de solvente se eliminan haciendo circular aire a través de la columna durante 2 a 10 minutos. Esta etapa mejora el rendimiento de extracción [52].

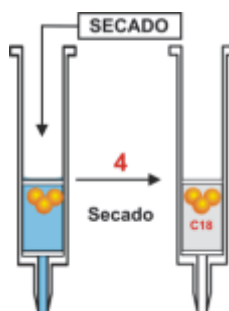


Figura 14. Etapa de secado SPE

ETAPA DE ELUCIÓN

Se pasa un solvente adecuado por la columna para eliminar la interacción analito-solvente y eluir el 100% de los compuestos de interés. El solvente adecuado ha de tener la máxima interacción con el analito y una interacción mínima con las demás impurezas, dejándolas en el lecho de adsorbente. El volumen de elución ha de ser el menor posible para mantener alto el factor de concentración [52].

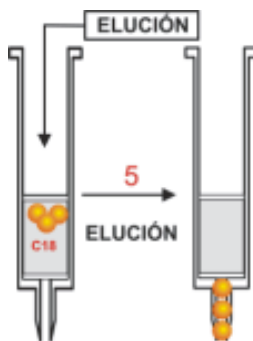


Figura 15. Etapa de elución SPE

ETAPA DE CONCENTRACIÓN

Los compuestos de interés se concentran evaporando una parte del solvente. Es necesario secar el eluato con sulfato de sodio para eliminar posibles trazas de agua. La muestra concentrada ya está lista para el análisis [27].

4.2.6.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DESARROLLADO POR LOS AUTORES

La tarea de optimizar el método consiste en una secuencia de tres pasos, los cuales permitirían evaluar la eficiencia de las diversas operaciones realizadas. Esta actividad se realiza generalmente por comparación cromatografía del eluato de extracción frente a solución estándar de los analitos sin extraer. Los tres pasos para la optimización del método son verificación del porcentaje de recuperación, la eficiencia en la eliminación de interferencias, y la validación [27].

4.2.6.1.1 PLANTEAMIENTO DE PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN PARA ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS (SPE)

Este proceso se realiza preparando soluciones de cada uno de los analitos individualmente en una solución con la condiciones que se han seleccionado para ajustar la matriz de la muestra. De esta manera cada analito estará libre de las interferencias y de los otros analitos. Estas soluciones deben prepararse al menos en tres concentraciones que difieran entre sí en un orden de magnitud. Cada una de estas soluciones se somete al proceso de extracción propuesto como método preliminar y luego se evalúa utilizando un sistema analítico [27].

Se realizaron diferentes ensayos de laboratorio, a continuación se muestra el método empleado por los autores de la presente monografía.

Se desea extraer los siguientes analitos: hexano, heptano, octano, nonano, decano, undecano, dodecano, tetradecano, pentadecano, hexadecano, heptadecano, octadecano, eicosano, tetracosano, octacosano, dotriacontano, hexatriacontano (Hidrocarburos alifáticos desde n-Hexano hasta n-Hexatriacontano) de una matriz acuosa para análisis por cromatografía.

Se ha seleccionado un cartucho C-18 de 100mg y se adoptaron las siguientes condiciones mostradas en la tabla 6

Ajuste de la matriz de la muestra	Estas condiciones son aplicables para extraer analitos no polares a moderadamente polares, razón por la cual es mejor eluirlos en fase reversa y la matriz debe hacerse lo más polar posible.
Acondicionamiento de la fase estacionaria	Se usan dos porciones alternas de 2 ml de hexano, seguido por una porción de 2 ml de diclorometano.
Aplicación de la muestra	Flujo lento por gravedad o por goteo. 2mL/min
Lavado	Se adicionan tres porciones secuenciales de 2 a 4 ml de solución final de acondicionamiento, seguida de dos porciones de metanol y/o mezclas de estos con agua.
Elución	Para eluir los analitos se pueden seleccionar un solvente con índice de polaridad entre 0 y 4.3 de manera que sea el más adecuado para el sistema de detección disponible. En este caso se uso pentano.

Tabla 6. Condiciones para la extracción SPE de hidrocarburos alifáticos [53].

Teniendo estas condiciones en la columna se realizó lo siguiente

Se prepararon tres soluciones de la mezcla de hidrocarburos en las concentraciones que se muestran en la tabla 7, el volumen de muestra a extraer se propuso en 25 ml, por lo tanto, los mg que deben extraerse en cada caso son los que se muestran en la columna derecha.

Analito	Concentración (mg/L)	mg en 25 mL muestra
Hidrocarburos alifáticos (hexano al hexatriacontano)	0.3	0.0075
Hidrocarburos alifáticos (hexano al hexatriacontano)	3	0.075
Hidrocarburos alifáticos (hexano al hexatriacontano)	30	0.75

Tabla 7. Planteamiento porcentaje de recuperación Hidrocarburos alifáticos

El volumen de redisolución final se propuso en 3ml en pentano. En estas condiciones se prepararon soluciones estándar en pentano de concentraciones 2.5 mg/L, 25 mg/L, y 250 mg/L.

Una vez preparadas las soluciones, se procede a hacer la comparación de los analitos eluidos con los mismos en las soluciones estándar. El proceso se puede realizar por comparación de áreas, por estándar externo, o por estándar interno.

Finalmente se tabulan las áreas promediadas y se calculan los porcentajes de recuperación en cada eluato individual, según la fórmula que se muestra a continuación.

% recuperación

$$\frac{A \text{ analito en eluato} \times 100}{A \text{ analito en estándar}}$$

4.2.6.2 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA REALIZADO PARA HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS

El siguiente procedimiento fue realizado por los autores del actual documento, y se plantea como una buena opción para realizar la extracción de los hidrocarburos alifáticos.

Se utilizaron cartuchos comerciales de Supelclean™ C18. -(CH₂)₁₇-CH₃ Octadecil

Los diferentes cartuchos se acondicionaron antes de ser utilizados, con el fin de solvatar las moléculas del adsorbente y de esta forma favorecer su interacción con los analitos que se requiere retener. Para condicionarlos se utilizaron sucesivamente 2 ml de hexano, 2 mL de cloruro de metileno y 2 ml de hexano. Posteriormente, la muestra de agua a extraer se colocó en el cartucho y se eluyó la fracción alifática con 3 mL de pentano. La elución se realizó a una velocidad aproximada de 0.2 mL/min. El volumen final de esta fracción fue de 3 ml y se inyectó 2.0 µl de ella en el cromatógrafo.

Cada muestra problema se preparó por triplicado y cada fracción obtenida se inyectó por triplicado al cromatógrafo. También se inyectó blanco de pentano, y así verificar posibles fuentes de contaminación e interferencia. Las concentraciones utilizadas para el porcentaje de recuperación han sido 30 ppm, 3 ppm y 0,3 ppm. El análisis cromatográfico para hidrocarburos alifáticos se mostró en el capítulo 3.

Algunos de los porcentajes de recuperación obtenidos son:

Para el n-Heptano: 79,1%

Para el n-Pentadecano: 87,2%

Para el n-Dotriacontano: 85,5%

Estos ejemplos de porcentaje de recuperación pueden ser muy importantes cuando se desee realizar la estandarización de la técnica de extracción en fase sólida, ya que dan un indicio de que el porcentaje de recuperación en general será alto, si se considera que métodos probados por la EPA aceptan porcentajes de recuperación entre el 70 y 120% [54].

Los porcentajes de recuperación mostrados para n-Heptano, n-Pentadecano, y n-Dotriacontano son de gran avance más no definitivos, ya que este procedimiento debe realizarse cumpliendo todos los parámetros estadísticos necesarios que se muestran en el capítulo 5. .

4.3 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

4.3.1 CONSIDERACIONES TEÓRICAS

La extracción líquido-líquido consiste en la separación de los componentes de una mezcla líquida por contacto con otro líquido inmiscible con ella o parcialmente inmiscible y que disuelve preferentemente a uno de los constituyentes.

La extracción líquido-líquido, también se conoce como extracción con disolventes, consiste en la separación de los componentes de una solución líquida por contacto con otro líquido parcialmente insoluble. Si las sustancias que componen la solución original se distribuyen de manera distinta entre las dos fases líquidas, se puede lograr cierto grado de separación, que puede incrementarse mediante el uso de contactos múltiples. En todas las operaciones de este tipo, la solución que se va a extraer se llama alimentación y disolvente el líquido con el cual se pone en contacto la alimentación.

Las aplicaciones de la extracción líquida se clasifican en varias categorías; aquellas aplicaciones en que la extracción está en competencia directa con otros métodos de separación y aquellas aplicaciones en que es el único método adecuado para separar.

Si se compara con otras operaciones de transferencia de masa, en la extracción líquida los costos relativos son importantes. La destilación y la evaporación son métodos directos de separación; los productos obtenidos están formados

básicamente de sustancias puras. Por otra parte, la extracción líquida produce nuevas soluciones, que a su vez deben separarse, usualmente por destilación o evaporación.

La extracción líquida que no provoca gastos químicos o eliminación de subproductos, puede ser menos costosa. En el caso de la extracción líquida los componentes principales de las dos fases son muy distintos químicamente; por esto, son posibles las separaciones de acuerdo con el tipo químico. Por ejemplo, los hidrocarburos aromáticos y parafínicos de masa molecular similar no se pueden separar por destilación, ya que sus presiones de vapor son casi iguales; sin embargo, pueden separarse fácilmente por extracción con distintos disolventes. [55]

En una situación ideal, la extracción líquido-líquido separaría una sustancia de una mezcla después de equilibrarse las fases. Sin embargo, en la práctica esto solo se logra en contadas ocasiones ya que, por una parte, no siempre se consigue la transferencia total desde un disolvente a otro y, por otra, es frecuente que al intentar separar una mezcla de sustancias, las diferencias en su tendencia a la transferencia sean pequeñas. Por ello, normalmente, no se consigue la separación completa. Antes de utilizar la extracción líquido-líquido es necesario plantearse la forma de llevar a cabo el proceso, es decir, elegir la técnica más adecuada para conseguir el grado de separación deseado.

Cabe distinguir tres tipos generales de técnicas de extracción líquido-líquido: simple, continua y contracorriente. La elección de una de ellas dependerá de las características de los componentes de la mezcla a separar y, en especial, de los valores individuales y relativos de las relaciones de distribución de dichos componentes. Si se trata de separar una mezcla sencilla cuyos componentes presentan valores muy dispares en sus relaciones de distribución, bastaría utilizar la extracción simple para lograr la separación. Si, por el contrario, la mezcla es compleja y/o las relaciones de distribución tienen valores similares será necesario utilizar una técnica de extracción más compleja. [56]



Figura 16. Imagen de embudo para extracción líquido-líquido

4.3.1.1 EXTRACCIÓN SIMPLE

Esta técnica consiste en realizar un único equilibrio entre ambas fases. Se utiliza cuando el valor de la relación de distribución del componente a separar es elevado mientras que el de los restantes es próximo a cero, de forma que el factor de separación tiene también un valor alto. En ciertos casos, los resultados obtenidos con esta técnica pueden mejorarse modificando la relación de volúmenes de las fases, esta variable actúa como un factor multiplicativo de la relación de distribución.

Para realizar la extracción simple se utiliza un embudo de decantación que es un recipiente generalmente de vidrio. Se cierra al exterior mediante un tapón de vidrio o teflón situado en su parte superior, y con una llave, también de vidrio o teflón en la inferior. Su volumen debe ser dos o tres veces superior a la suma de los volúmenes de ambas fases para que se pueda realizar adecuadamente la agitación del sistema [56].

4.3.1.2 EXTRACCIÓN REPETITIVA

Cuando la relación de distribución no tiene un valor elevado, de forma que mediante la extracción simple no se consigue la separación deseada, es necesario recurrir a la extracción repetitiva que consiste en poner en contacto repetidas veces la fase que contiene la mezcla a separar, generalmente la acuosa, con porciones frescas de la segunda fase, alcanzándose en cada caso el equilibrio [56].

4.3.1.3 EXTRACCIÓN POR ETAPAS

Consiste en realizar de forma secuencial un número determinado de extracciones simples retirando después de cada equilibrio la fase orgánica y poniendo en contacto la fase acuosa con un volumen nuevo de fase orgánica. Finalmente se reúnen todas las porciones de disolvente orgánico que contiene el soluto separado [56].

4.3.2 APLICACIONES

La técnica de extracción líquido-líquido se utiliza ampliamente en química analítica con los fines siguientes: como técnica de separación, siendo este, quizás, su principal campo de aplicación. Cabe distinguir distintos aspectos:

- Aumento de la selectividad de un método ya que de forma simple y relativamente rápida se eliminan las interferencias que perturban la determinación de un componente de una muestra.
- Mejora de las características generales de una determinación analítica. En numerosas ocasiones la separación de un analito a una fase orgánica conlleva una serie de ventajas como, por ejemplo, aumento de la sensibilidad, ya que al disminuir la constante dieléctrica del medio disminuye la disociación del compuesto formado, aumentando la señal analítica.
- Purificación de reactivos que contengan, por ejemplo, trazas metálicas, las cuales pueden eliminarse utilizando extractante adecuado.

Para la concentración de trazas. Siempre que la relación de distribución de la especie que se desea concentrar sea suficientemente elevada, puede tratarse un volumen de disolución acuosa que contiene la especie de interés con un volumen mucho menor de la fase orgánica, consiguiéndose su transferencia y, por tanto, aumentar su concentración.

Para realizar estudios teóricos de equilibrio en disolución. La utilización correcta de esta técnica permite determinar constantes de equilibrio tales como constantes de acidez, de estabilidad de complejos y de productos de solubilidad [56].

La extracción líquido-líquido es muy usada en los laboratorios para el tratamiento previo de las muestras antes de realizar el análisis cromatográfico. Uno de estos análisis fue el realizado en Quito, Ecuador, en donde se determinó hidrocarburos totales de petróleo en agua por cromatografía de gases. Para la extracción de estos hidrocarburos de las muestras de agua se usó extracción líquido-líquido. En

el proceso se tomo como base el método EPA 8015. Allí se analizaron 67 muestras de agua de diversos orígenes, como descargas líquidas en diferentes procesos de las refinerías [34].

Otro trabajo de investigación se realizó por parte de la UNESCO para determinar hidrocarburos de petróleo en sedimentos. En este análisis se reportó la siguiente metodología realizada en el proceso de extracción

Se enfría el extracto de metanol a la temperatura ambiente, se pasa a un embudo de separación y se extrae dos veces con 25 mL de pentano. Se separa la fase de metanol de la fase de pentano y se pasa esta última a un matraz de evaporación y se reduce el volumen a 0,5 mL utilizando un rota evaporador. Se trasvasa cuantitativamente el volumen reducido a un vial de vidrio utilizando pentano. Se concentra cuidadosamente este extracto hasta obtener aproximadamente 0,2 mL utilizando N₂ gaseoso seco antes del lavado en una columna de alúmina [29].

En la tabla 8 se muestra la miscibilidad, y diferentes propiedades de disolventes usados en la extracción líquido-líquido y SPE.

		Indice de Polaridad
		Acetona 5,1
		n-butanol 4,0
		Ciclohexano 0,2
		Cloroformo 4,1
		1,2 Dicloroetano 3,5
		Diclorometano 3,1
		Etanol 5,2
		Dimetil Sulfóxido 7,2
		Eter dietílico 2,8
		Heptano 0,0
		Hexano 0,0
		Metanol 5,1
		Metil-t-Butil Eter 2,5
		Pentano 0,0
		n-propanol 4,0
		Iso-propanol 3,9
		Tetracloruro de c 1,6
		Tolueno 2,4
		Tricloroetileno 1,0
		Xileno 2,5

	Inmiscible	Miscible
Xileno		
Tricloroetileno		
Tolueno		
Tetracloruro de c		
Iso-propanol		
n-propanol		
Pentano		
Metil-t-Butil Eter		
Metanol		
Hexano		
Heptano		
Eter dietílico		
Dimetil Sulfóxido		
Etanol		
Diclorometano		
1,2 Dicloroetano		
Cloroformo		
Ciclohexano		
n-butanol		
Acetona		

Tabla 8. Miscibilidad de diferentes disolventes usados en SPE [57].

4.4 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

A mediados de los años 80 se empezó a investigar la extracción de compuestos orgánicos de una fase acuosa o gaseosa mediante trampas tubulares abiertas y revestidas con capas gruesas de polidimetilsiloxano (PDMS). Sin embargo, su aplicación quedó limitada debido a su pequeña capacidad de muestreo y a los pequeños volúmenes de autoelución. En 1989, Arthur y Pawliszyn desarrollaron un método de microextracción basado en la sorción sobre PDMS al que llamaron microextracción en fase sólida.

La SPME es una técnica de extracción de los analitos de la matriz de la muestra que se caracteriza por ser rápida, económica, limpia y versátil, y que puede acoplarse a la cromatografía de gases y a la cromatografía líquida. Utiliza fibras de sílice fundida revestidas con un polímero para extraer los analitos de las muestras. El pequeño diámetro de la fibra y su geometría cilíndrica permiten

incorporarla en una jeringa. De esta forma se facilita su manipulación y se protege la fibra cuando no se utiliza. En la Figura 17 se muestra un dispositivo convencional de SPME. Su diseño hace de ésta una técnica adecuada para el análisis de campo

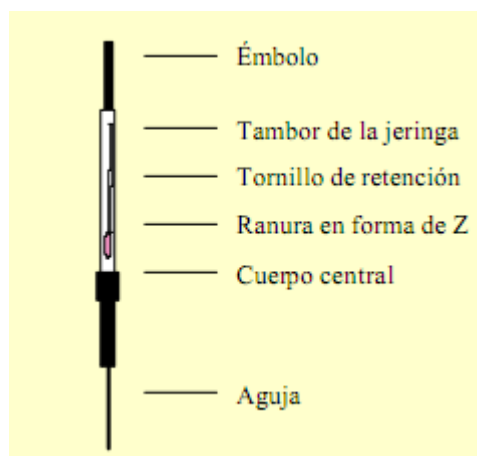


Figura 17. Esquema del dispositivo comercial de SPME

Esta técnica de extracción no utiliza disolventes y requiere pequeños volúmenes de muestra. Con sólo tres tipos de materiales adsorbentes se cubre una gran variedad de analitos como los hidrocarburos a determinar en muestras líquidas, sólidas o gaseosas. Como inconveniente se puede mencionar que debido a la limitada capacidad de extracción de las fibras (la cantidad de fase estacionaria es muy pequeña) la sensibilidad que puede alcanzarse es también limitada, sobre todo si se acopla a la Cromatografía líquida. Existen dos tipos de mecanismos de extracción en función de los distintos sorbentes de SPME disponibles comercialmente. El más usado es el polidimetilsiloxano (PDMS), que es líquido. Las fibras de PDMS y las de poliacrilato (PA) extraen los analitos por absorción, disolviéndolos. El resto de sorbentes, incluyendo PDMS-DVB (divinilbenceno), Carbowax-DVB, Carbowax-TPR (plantilla de resina) y Carboxen (Car)- PDMS, son mezclas de capas, en las que la fase primaria de extracción es un sólido [46].

A continuación se muestra un método realizado para determinar hidrocarburos totales mediante cromatografía de gases y microextracción en fase sólida. Para este trabajo uso una fibra recubierta con 100 cm de PDMS. La fibra de 100 cm usada es una fase no unida químicamente, de la firma SUPELCO, modelo 57300LJ y aguja estándar. Esta fibra se usa para compuestos volátiles y de peso molecular bajo. Para esta fibra, la temperatura de trabajo recomendada está entre 200 y 270 °C. La fase PDMS de la fibra es soluble en compuestos no polares por lo que no debe usarse con solventes no polares. Compuestos semivolátiles y de

peso molecular más alto son extraídos más eficientemente, con una fibra de 7 cm de PDMS.

Respecto a la agitación para el proceso de adsorción, se introduce durante la toma de la muestra una pequeña barra magnética forrada de vidrio en el recipiente. Para fines de reproducibilidad de los análisis en este trabajo, se realizó la agitación magnética con una velocidad (500 r.p.m.), marca Corning modelo AC 342 [39].

4.5 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS

Las microondas son ondas electromagnéticas cuyo intervalo de frecuencias se encuentra entre 300 y 3×10^6 MHz. En este intervalo de frecuencias, la radiación interacciona con la materia provocando el desplazamiento de iones y tránsitos rotacionales, pero no causa cambios en la estructura molecular.

La extracción asistida por microondas (MAE, microwave assisted extraction) es una clara alternativa a la extracción Soxhlet ya que permite un calentamiento más rápido y eficiente de la muestra. La muestra se extrae aplicando energía de microondas en un disolvente adecuado. Este tipo de radiación permite el calentamiento selectivo de la muestra según el disolvente utilizado. Esta técnica de extracción depende de la matriz y limita los disolventes que se pueden emplear, ya que conviene que éstos no sean transparentes a la radiación de microondas y que tengan un elevado momento dipolar, sin olvidar la solubilidad de los analitos en los mismos. En general, cuanto mayor sea el momento dipolar del disolvente, mayor será su capacidad de extracción. Así, el hexano, cuyo momento dipolar es prácticamente nulo, es transparente a la radiación de microondas y apenas se calienta cuando se usa dicha radiación. En cambio, la acetona tiene un momento dipolar más alto y se calentará en pocos segundos, aunque algunos compuestos orgánicos presentan una mejor solubilidad en hexano. Por este motivo, la mayoría de los métodos desarrollados para la MAE emplean mezclas de hexano y acetona como disolvente extractante.

Las muestras junto con el disolvente de extracción se irradian con las microondas durante cortos periodos de tiempo y como consecuencia se produce un aumento de la temperatura que favorece la transferencia de los compuestos retenidos en la matriz al disolvente. Esta técnica extractiva es rápida, ya que los tiempos de irradiación son muy cortos, y además se pueden extraer varias muestras simultáneamente. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes tales como la dificultad de ser automatizada o acoplada a las técnicas de análisis, así como la necesidad de centrifugar o filtrar la muestra después del proceso de extracción.

Los parámetros a tener en cuenta a la hora de optimizar un método basado en la extracción MAE son la composición del agente extractante y su volumen, la temperatura y el tiempo de extracción, así como la naturaleza de la matriz. La temperatura juega un papel muy importante en el proceso, ya que un aumento de la temperatura se refleja en una mayor capacidad del disolvente para solubilizar los analitos, pero hay que tener cuidado con la posible degradación de los mismos [58].



Figura 18. Sistema de extracción asistida por microondas MSP-1000

Son mínimos los estudios realizados para determinar hidrocarburos alifáticos usando extracción asistida por microondas, pero son más comunes para hidrocarburos aromáticos. Se muestra un trabajo realizado para determinar hidrocarburos aromáticos policíclicos usando cromatografía de gases con detector FID, este análisis puede dar un enfoque si se desea usar esta extracción para hidrocarburos alifáticos. En esta investigación se usó extracción asistida por microondas acoplado con la técnica espacio de cabeza estático (STATIC HEADSPACE) y microextracción en fase sólida. (MA-HS-SPME). La extracción se realizó en muestras acuosas. Los límites de detección variaron entre 0,03 a 1 $\mu\text{g/L}$. La desviación estándar relativa fue menor al 13%. El porcentaje de recuperación fue mayor a 88% y el porcentaje de desviación estándar relativo fue inferior a 17% [59].

4.6 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO

La extracción asistida por ultrasonidos (ultrasound-assisted solvent extraction, USE) es una técnica convencional, utilizada de manera habitual para la extracción

de contaminantes en muestras sólidas y en algunos casos de muestras acuosas. Los ultrasonidos son ondas sonoras con una frecuencia de vibración entre 16 kHz a 1 GHz. Esas ondas generan en el medio un fenómeno conocido como cavitación acústica, que consiste en la formación de burbujas y su posterior implosión. El colapso de estas burbujas genera microgradientes con elevadas presiones y temperaturas, durante intervalos de tiempo cortos. En química analítica, la irradiación con ultrasonidos ha sido utilizada como una herramienta poderosa, para la extracción de diferentes analitos de muestras. Si es una muestra sólida se deposita en un tubo de vidrio, se añade la cantidad suficiente de disolvente orgánico y se agita con ultrasonidos durante el tiempo necesario. Generalmente, el tubo se introduce en un baño de ultrasonidos, aunque también existe la posibilidad de introducir una aguja sónica en la muestra [60].

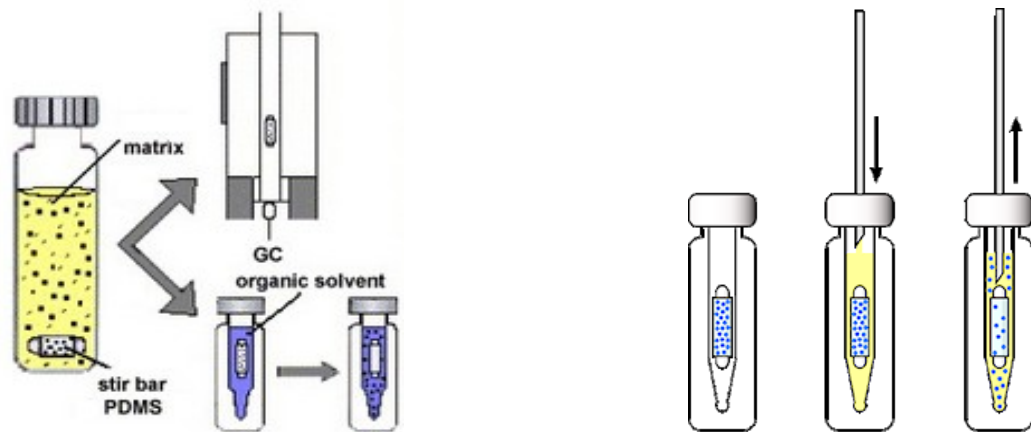
El método EPA 3550B muestra la siguiente metodología para compuestos semivolátiles. La muestra se mezcla con sulfato sódico anhidro y se extrae tres veces con la mezcla de disolventes acetona: CH_2Cl_2 (1:1). El sistema de ultrasonidos debe tener una potencia superior a 300 vatios. La aplicación de la técnica debe validarse en función de la matriz y los analitos con la extracción soxhlet, para verificar que la sonicación no provoca la destrucción de los analitos.

Los análisis reportados usando extracción asistida por ultrasonido con el fin de identificar hidrocarburos alifáticos son muy pocos, uno de ellos fue un análisis realizado para diferentes tipos de hidrocarburos en Chile. Este trabajo se realizó en sedimentos de Seno Aysén y canal Moraleda. Allí se realizó la extracción de lípidos mediante ultrasonido en una serie secuencial de solventes (metanol, metanol/diclorometano, diclorometano). Se obtuvieron por cromatografía de columna, utilizando solventes de creciente polaridad. Los hidrocarburos alifáticos lineales y ramificados como también los hopanoides se obtuvieron en la fracción apolar al ser eluída con n-hexano [32].

4.7 EXTRACCIÓN MEDIANTE BARRA DE AGITACIÓN (STIR BAR)

En 1999, Baltussen y colaboradores desarrollaron una técnica cuyo mecanismo de extracción es muy parecido al del la SPME, denominada extracción mediante barra de agitación SBSE, (stir bar sorptive extraction). Ésta consiste en el uso de una barra de agitación recubierta con una fase sólida, por lo general PDMS, que se introduce en las muestras acuosas. Después de 30 a 240 minutos que dura la extracción, en la que los analitos han quedado adsorbidos en el PDMS, la desorción puede ser térmica para el análisis por cromatografía de gases o empleando disolventes orgánicos para utilizar la cromatografía líquida. El PDMS es una fase no polar por lo que es preferible que los analitos no tengan una alta polaridad.

Esta técnica se ha empleado asimismo para el análisis de compuestos volátiles en aguas como diferentes tipos de hidrocarburos. Se indica en diferentes trabajos que los límites de detección obtenidos con esta técnica son más bajos que los de SPME, debido a la cantidad más alta de fase sólida (50-250 veces mayor) que cubre la barra en comparación con la usada en las fibras. Sin embargo, hay que tener en cuenta que es necesaria una retención selectiva de los analitos frente a los componentes de la matriz para alcanzar límites de cuantificación mejores. En un análisis realizado por parte del instituto francés de investigación para la explotación del recurso marítimo usando la extracción stir bar (SBSE) para determinar hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras acuosas, se obtuvo un porcentaje de desviación relativa comprendido entre 1 y 48% [58, 61].



4.8 TÉCNICA ANÁLISIS POR ESPACIO DE CABEZA ESTÁTICO O STATIC HEADSPACE ANALYSIS (HAS)

Esta técnica es usada para la concentración y análisis de componentes orgánicos Volátiles. Es una técnica relativamente simple y de buena sensibilidad. La popularidad de la técnica HSA ha crecido mundialmente para diferentes tipos de análisis donde se desee observar compuestos volátiles como lo hidrocarburos.

Se conocen en el mercado dos técnicas de head space, una estática y otra dinámica. En la primera de estas se introduce la muestra en un vial llenándolo hasta la mitad, este se sella y coloca en un termostato para dirigir los componentes volátiles como hidrocarburos hacia la fase de vapor (espacio superior del vial conocido como head space). Con ayuda de una jeringa o un dispositivo similar se toma una alícuota de dicha fase, que posteriormente será inyectada al cromatógrafo de gases. La técnica implica que la muestra fue tomada de una fase en equilibrio.

Para incrementar la sensibilidad se desarrolló el head space dinámico, donde la fase de equilibrio está siendo desplazada continuamente, dirigiendo el head space fuera del vial con ayuda de un gas inerte hacia un sistema de purga y trampa, donde los analitos serán atrapados por un adsorbente y posteriormente desorbidos por calor para introducirse en el cromatógrafo de gases. El aditamento de head space dinámico requiere de una inversión inicial alta, por lo que no resulta un método de fácil acceso [60].

CAPÍTULO 5

ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

5.1 ESTANDARIZACIÓN

Estandarizar un método analítico consiste en verificar y documentar, que este conduzca con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos.

La estandarización de un método analítico es un proceso riguroso que dependiendo de la técnica analítica a la que pertenezca el método, la matriz, el analito, la cantidad de parámetros de la estandarización, y de la logística empleada para su desarrollo, puede requerir de un tiempo más o menos considerable [62].

5.2 VALIDACIÓN

La validación de un método según la farmacopea de Estados Unidos (USP) consiste en desarrollar el mismo, asegurándose que sea exacto, específico, reproducible y robusto, dentro de un rango establecido en el cual será determinado el analito. Algunos de los parámetros implicados en la validación de un método son: Linealidad, Sensibilidad, Limite de detección, Limite de cuantificación, precisión, Exactitud.

5.3 PARAMETROS DE CALIDAD

Los parámetros de calidad son los criterios cuantitativos que se utilizan para decidir si un método es adecuado o no para resolver un determinado problema analítico. Son, por lo tanto los criterios que se utilizan en la validación de los métodos analíticos (para demostrar su validez en la resolución de un problema analítico). Los parámetros de calidad son la materialización o expresión numérica de características o indicadores de calidad de los métodos tales como la precisión, exactitud, sensibilidad, selectividad, linealidad, rango, limite de detección y limite de cuantificación [63].

En la Tabla 9 se observan diferentes parámetros de calidad de los métodos analíticos.

Característica	Parámetro de calidad
Precisión	Desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa, coeficiente de variación, varianza.
Exactitud	Error relativo, error absoluto, porcentaje de recuperación
Sensibilidad	Pendiente de recta de calibrado
Selectividad	Coeficiente de selectividad
Robustez	Desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa, coeficiente de variación, varianza.

Tabla 9. Parámetros de calidad de los métodos analíticos.

5.3.1 EXACTITUD

Se define exactitud como la cercanía de la medida de una variable a su valor verdadero. Cuando un método posee una elevada exactitud, la medida de la muestra proporciona un valor que idealmente es idéntico al valor verdadero (previamente conocido). Generalmente la exactitud de un método se calcula mediante estudios de recuperación, aunque también se puede determinar por análisis de una material estándar de referencia, o por comparación con un método previamente validado.

En los estudios de recuperación, el método se aplica a una muestra a la que se le ha añadido previamente una cantidad conocida de analito y se expresa como el porcentaje de analito recuperado tras el ensayo [64].

Para calcular la exactitud se debe preparar por triplicado tres niveles de concentración diferentes. Con los datos obtenidos se realiza el cálculo de la desviación estándar y la exactitud (expresada como porcentaje de error); mediante la siguiente ecuación.

$$\%E = \frac{\text{Dato Experimental} - \text{Dato Real}}{\text{Dato Real}} * 100$$

5.3.2 PRECISIÓN

Se define precisión como el grado de concordancia entre los resultados de test individuales cuando el procedimiento es aplicado repetidas veces para una muestra homogénea. Generalmente, la precisión de un método se expresa en términos de desviación estándar (SD) o desviación estándar relativa en % (coeficiente de variación, RSD). La precisión de un método puede estimarse de varias formas:

Repetibilidad instrumental: Grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando una misma muestra es analizada repetidamente por el mismo analista, en el mismo equipo y en un corto periodo de tiempo.

Repetibilidad del método: grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando el método es aplicado repetidamente por el mismo analista, en el mismo equipo y en un corto periodo de tiempo.

Precisión intermedia: grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando se realizan pequeñas variaciones en el laboratorio como distintos días, diferentes analistas o equipos.

Reproducibilidad: grado de concordancia entre resultados obtenidos cuando el método es aplicado en distintos laboratorios.

Los estudios de precisión de un método analítico deben realizarse con un número suficiente de alícuotas que permita un cálculo estadístico correcto tanto de la desviación estándar como del coeficiente de variación [64].

5.3.3 SELECTIVIDAD O ESPECIFICIDAD

La selectividad es uno de los aspectos más importantes de un método analítico y puede definirse como su habilidad para medir específicamente un analito en presencia de otros componentes que pueden formar parte de la muestra. La determinación de la selectividad de un método se lleva a cabo comparando los resultados de un análisis obtenido para una muestra que contiene los posibles componentes interferentes (impurezas, compuestos de degradación, componentes de la matriz) que podamos encontrar en la muestra real con los resultados obtenidos para una muestra sin interferentes [64].

5.3.4 LIMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de detección (LD) se puede definir como la concentración más baja del analito presente en una muestra que puede ser detectable, pero no necesariamente cuantificable, en las condiciones experimentales de trabajo

El límite de cuantificación (LC) se puede definir como la concentración mas baja del analito presente en una muestra que puede ser determinada con una precisión y exactitud aceptable en las condiciones experimentales de trabajo.

Ambos se expresan normalmente en términos de concentración de analito en la muestra, y en un método instrumental se pueden determinar de varias formas. En algunos caso se determinan como la relación señal/ruido (S/R) obtenida entre resultados de muestras con concentraciones conocidas de analito y resultados obtenidos en muestras blanco y se establece que el LD es la concentración que proporciona una relación S/R de 2 o 3 el LC es la concentración que proporciona una relación S/R de 10. En otros casos se estiman a través de la desviación estándar multiplicada por un factor de 10 proporciona una estimación de la señal mínima cuantificable [64].

En muestras de agua, el límite de cuantificación se encuentra en 0,1 mg/l. El límite superior de aplicación es hasta una concentración de 150 mg/l. En caso de concentraciones elevadas si la muestra contiene sustancias lipófilas o tensoactivos adicionales se incrementa la posibilidad de error, determinándose valores inferiores a los reales [30].

5.3.5 LINEALIDAD Y RANGO

La linealidad de un método analítico es su habilidad para proporcionar resultados que sean, directamente o mediante transformación matemática, proporcionales a la concentración de analito presente en la muestra dentro de un rango determinado.

El rango de un método analítico puede definirse como o intervalo de concentraciones, incluyendo la más baja más alta en el cual se pueden realizar determinaciones del analito con adecuada precisión, exactitud y linealidad

La linealidad de un método analítico se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis de disoluciones patrón con diferentes concentraciones conocidas de analito incluidas en el rango

El rango de un método debe ser comprobado realizando un estudio conveniente de precisión, exactitud y linealidad en los extremos del mismo [64].

En el documento Validación de un método analítico para la determinación de contaminantes orgánicos [66] se reporta la siguiente metodología para determinar la linealidad del método de análisis de sustancias volátiles como los hidrocarburos alifáticos.

Allí se considero la desviación estándar relativa (RSD) de los factores de respuesta, es decir su coeficiente de variación (CV). Una vez obtenido los datos de la curva de calibración (respuesta del detector para cada uno de los estándares de las diferentes concentraciones), se calcularon los factores de respuesta para cada punto de la curva con la siguiente ecuación.

$$F.R = \text{Respuesta del detector} / \text{concentración del estándar}$$

En este documento se reporta la respuesta del detector como la altura del pico, y la concentración del estándar se emplea en nanogramos de inyección para las curvas de inyección directa o en ng/mL para las curvas realizadas con SPE o SPME.

Cuando se obtuvo los factores de respuesta se reporta el cálculo de la desviación estándar ó coeficiente de variación mediante la siguiente ecuación.

$$CV = (SD \times 100) / \text{Promedio de los F.R}$$

CV= Por ciento del coeficiente de variación

SD= Desviación estándar de los factores de respuesta

5.3.6 SENSIBILIDAD

Mide la capacidad de un método para distinguir pequeñas diferencias en la concentración del analito. Los factores que determinan la sensibilidad son la pendiente de la recta de calibrado y la precisión, de manera que si dos métodos tienen igual precisión será más sensible que tenga una recta con mayor pendiente, y si dos métodos tienen pendiente será más sensible el que presente mayor precisión. La sensibilidad de un método puede expresarse como:

- Sensibilidad de la calibración (m): es la pendiente de la recta de calibrado

- Sensibilidad analítica (γ): se expresa como la pendiente de la recta de calibrado dividida entre la desviación estándar de las medidas (precisión).

La sensibilidad de calibración tiene la ventaja de que es independiente de la concentración. Sin embargo como tiene la desventaja de que no tiene en cuenta la precisión de las medidas. Por su parte, la sensibilidad analítica tiene la ventaja de ser insensible a los factores de amplificación [64].

5.3.7 ROBUSTEZ

Es la capacidad del método analítico para no ser afectado por pequeños pero deliberados cambios en las condiciones experimentales. El estudio de la robustez del método trata de evaluar como la variación aleatoria de las condiciones experimentales repercuten en la variabilidad de los resultados obtenidos, expresada como desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa coeficiente de variación de los mismos.

Para evaluar la robustez del método hay que identificar cuáles son los factores experimentales [64].

5.4 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO PLANTEADO POR LOS AUTORES PARA EL ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS.

Para dar un avance en la calibración de método cromatográfico se realizaron diluciones a partir del estándar. La curva realizada para cada hidrocarburo alifático está comprendida entre los valores de 0,1 a 100 ppm, estos valores se seleccionaron porque eran los que mejor correlacionaban con una línea recta. Se recomienda cuando se desee estandarizar la técnica inyectar cada patrón 5 veces al cromatografo, y seleccionar los tres resultados de área más próximos para asegurar la reproducibilidad y confiabilidad del método.

Para la curva de calibración de los diferentes hidrocarburos alifáticos se calcularon los parámetros estadísticos necesarios para realizar un desarrollo importante a la estandarización del método tales como:

R^2 : Coeficiente de correlación

%RSD: Porcentaje de desviación estándar relativa

LD: Limite de detección

LC: Limite de cuantificación

Exactitud

Para cada nivel de concentración se debe determinar la media y el porcentaje de desviación estándar relativa, así:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \text{RSD} = \frac{S * 100}{\bar{x}}$$

Los valores de R^2 y %RSD son suministrados por el software GC-Solution con el cual se maneja el equipo. El software determina %RSD mediante el procedimiento de coeficientes de variación de los factores de respuesta (f), en el cual f expresa la relación entre la lectura o respuesta (área) y la concentración. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre si y cercanos al valor de la pendiente.

Los pasos a seguir son:

-Calcular f para cada concentración mediante la siguiente formula

$$f = y_i / x_i$$

Donde y_i es la respuesta (área) y x_i la concentración

-Determinar promedio de los factores de respuesta y desviación estándar de los factores de respuesta (SD)

-Calcular el porcentaje de desviación estándar relativa

En la tabla 10 se observa los datos para el cálculo de %RSD para el n-Octano, y en la figura 19 se observa la curva de calibración para el n-Octano. .

X Concentración	Y (Área promedio)	F (Factor de respuesta)
0,1	66	660,00
0,4	136	340,00
0,7	390	557,14
1	614	614,00
4	2748	687,00
7	3806	543,77
10	7992	799,24
40	28480	712,00
70	51644	737,77
100	74005	740,05
PROMEDIO		639,10
SD		133,43
%RSD		20,87

Tabla 10. Datos para el cálculo de %RSD para el n-Octano.

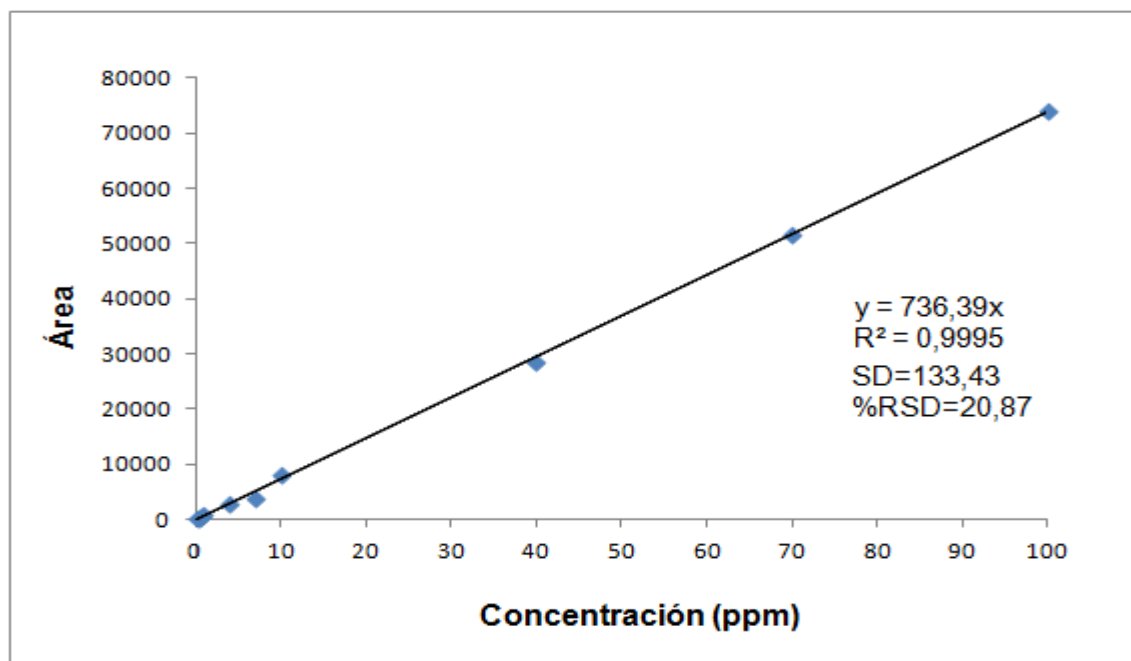


Figura 19. Curva de calibración del n-Octano.

Para determinar el LD Y LC se recomienda usar el método basado en la extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero, el cual es un procedimiento aplicable a métodos analíticos instrumentales. El método consiste en:

1) Determinar la pendiente de la curva de calibración (Concentración vs área)

2) se obtiene otra curva de calibración, inyectando cada punto por triplicado, pero solo se deben correr los tres patrones de menor concentración de analito, determinándose la ecuación de esta nueva curva de calibración y se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco Y_{bl} .

3) Se determina la desviación estándar perteneciente a cada concentración del punto 2, se calcula la recta correspondiente a desviación vs desviación estándar (SD) y se extrapola la concentración a desviación cero, obteniéndose SD_{bl} , correspondiente a la desviación estándar del blanco.

Se calcula el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación así:

Límite de detección

$$= \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Límite de cuantificación

$$= \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Los métodos mencionados serán de gran ayuda a la hora de realizar la estandarización del método. Sin embargo, es importante aclarar que en este documento no se pudo lograr un tratamiento estadístico completo debido a problemas técnicos presentados con el cromatógrafo de gases.

5.4.1 INDICADORES DE RELACIÓN LINEAL

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (R^2)

Para que el modelo evaluado sea suficientemente confiable en el rango de concentración trabajado, es necesario que estos valores se acerquen a la unidad

lo cual indicaría que se establece una correlación altamente significativa. En el ejemplo dado para el hidrocarburo alifático n-Octano, el coeficiente de correlación determinado corresponde a una cifra altamente significativa ($P < 0,01$) entre los puntos analizados.

5.4.2. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO PARA EL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN USANDO EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

La recuperación de los hidrocarburos alifáticos a partir de una matriz acuosa se utiliza como una medida del método. Es importante estar seguros que la extracción recupera la parte de los analitos, en este caso los hidrocarburos.

La extracción en fase sólida (SPE) de los hidrocarburos puede evidenciar buenos porcentajes de recuperación si se encuentra dentro del rango 70 a 120%. Así lo indican diferentes métodos aprobados por la EPA.

La magnitud porcentual o la masa relativa del analito y la complejidad de la matriz resulta de importancia para la determinación %RSD por lo cual para el análisis de trazas son apropiados %RSD de 5 a 10% o un poco mayores [65]

La precisión es especialmente importante en la preparación de muestras, esta generalmente disminuye con la disminución de la concentración del analito, y además puede verse afectada dependiendo de los pasos en el proceso de medida. Para el caso de la SPE la variabilidad puede venir del propio cartucho, el lavado, la extracción, el secado, o los pasos de redisolución, por lo cual se debe controlar al máximo estas variables para tratar de reducir la incertidumbre durante la preparación de la muestra [48].

5.5 CASO DE ESTUDIO SOBRE LA EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FUNCIONAMIENTO EN GC-FID PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (TPH)

La comparación entre diferentes laboratorios que han realizado análisis de hidrocarburos, indica que muchos tienen problemas en arrojar resultados aceptables y de calidad, probablemente por las variaciones en las condiciones usadas en el análisis cromatográfico.

El departamento de química de la universidad Oulu en Finlandia propuso un trabajo en donde se usó un diseño óptimo para comparar diferentes factores instrumentales que afectan los resultados de TPH. Se seleccionaron para este estudio 6 factores, uno comprende el análisis cualitativo (diseño de Liner) y los otros 5 análisis cuantitativo (Temperatura de inyección, Split, volumen de inyección, temperatura del FID y flujo de la columna)

Se usaron los métodos propuestos por International Organization for standardization (ISO) (método ISO/FDIS 16703:2004) en la determinación de hidrocarburos totales de petróleo.

En este estudio se preparó un diseño experimental aleatorio, usando el software MODDE 7.0 para el diseño de los experimentos y la optimización por cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo de gases HP Agilent 6890 equipado con detector FID.. Automuestreador. Columna capilar Supelco TM-5 (15 m × 0,25 mm i.d.) con un grosor de 0.25 µm.

El volumen de inyección se varió de 1 a 3 µl y la temperatura de inyección de 260 ° C a 330 ° C. Se utilizó helio como gas portador (flujo de columna variada de 1 a 3 mL/min).

Se realizaron diversos estudios para encontrar un programa de temperatura que proporcionara la separación requerida para los n-alcanos El programa de horno GC se inicio a 35 ° C, se mantuvo por 1.50 min, luego aumentó hasta 60 ° C a 5 ° C/min, posterior a esto se aumentó hasta 310 ° C a 15 ° C /min y, a continuación, se dejó en 310 ° C durante 10 minutos. La temperatura del detector de ionización de llama varió entre 300 y 330 ° C.

Las variables se seleccionaron haciendo énfasis en los métodos usados por los diferentes laboratorios Los factores investigados se muestran en la tabla 11.

Factor	Unidad	Tipo	Low level (-1)	High level (+1)
F1 Temperatura inyección	°C	Cuantitativo	260	330
F2 Split	Min	Cuantitativo	2	4
F3 Volumen inyección	µl	Cuantitativo	1	3
F4 Temperatura FID	°C	Cuantitativo	300	330
F5 Flujo de columna	ml/min	Cuantitativo	2	3
F6 Liner design	-	Cualitativo	With ads	No ads

Tabla 11. Factores y sus niveles usados para el diseño D-optimal.

Se usó el método D-Optimal ya que generó un procedimiento estadístico sencillo y óptimo, permitiendo la comparación de los efectos de los factores sobre la respuesta seleccionada, generando una matriz, de 42 corridas.

Para el análisis cromatográfico se preparó una solución de n-Heptano, n-Decano, n-Eicosano y n-Tetracontano. Esta solución se dividió en 42 muestras, las cuales fueron analizadas de acuerdo al diseño D-Optimal.

De acuerdo a los estándares para la determinación de hidrocarburos totales la respuesta de n-tetracontano (n-C40) frente a la de n-eicosano (n-C20) debe estar entre 0,8 y 1,0.

Al pico con el área más pequeña se le asignó un valor de 0,8 y el pico con área mayor un valor de 1,0.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95 % ($p < 0.05$). El ANOVA consistió en aplicar una regresión lineal múltiple (MLR), la cual estima los coeficientes de la ecuación lineal, con una o más variables independientes, que mejor prediga el valor de la variable dependiente; es decir se puede explicar el comportamiento de una determinada variable denominada variable a explicar, variable endógena o variable dependiente.

El experimento arrojó un coeficiente de correlación R^2 de 0,976 y %RSD de 5,66. Así mismo se comprobó que el factor más importante es el diseño de liner. El segundo más importante es la temperatura de inyección, seguido de cerca por el volumen de inyección. Se determinó que la temperatura del detector, el flujo de columna, y split son menos influyentes en la variación de los resultados finales, como se puede observar en la figura 20.

Se generaron valores inaceptables cuando se usó el liner sin recubrimiento con material adsorbente. En contraste se lograron resultados favorables cuando se uso un liner con material adsorbente, que amplía la superficie de vaporización.

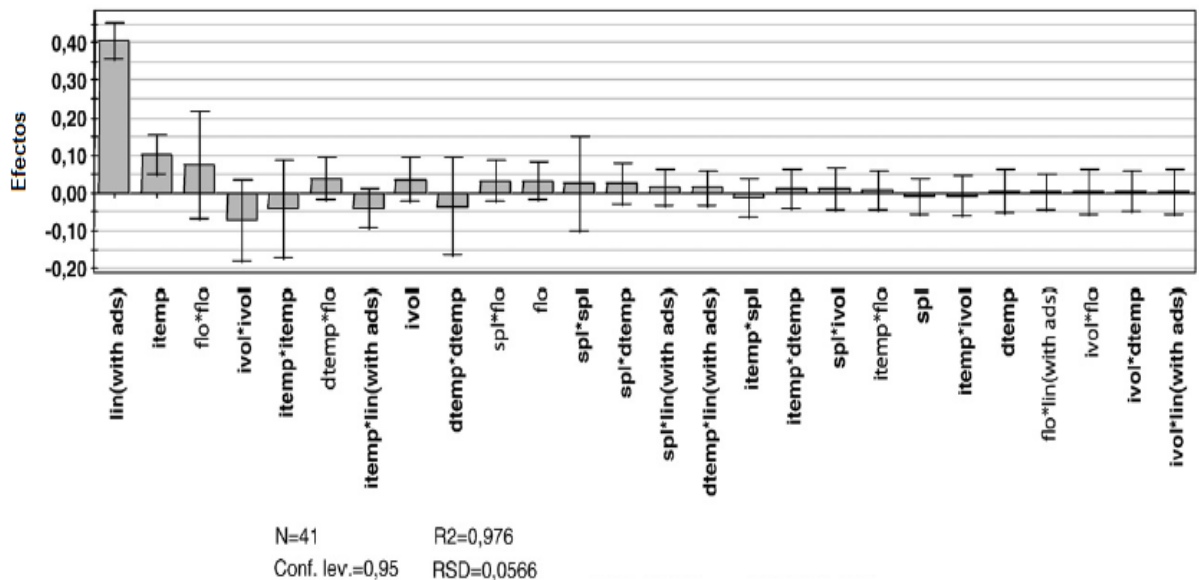


Figura 20. Efectos generados al variar los factores establecidos para la evaluación de las condiciones de funcionamiento en GC-FID.

Cuando la superficie de vaporización se amplía, mejora la vaporización de los hidrocarburos menos volátiles, especialmente los compuestos con punto de ebullición más alto. En este experimento se pudo detallar que los picos con área mas baja corresponden a n-C40 usando un liner sin recubrimiento con material adsorbente, mientras que para n-C20 se obtuvo un área mucho mayor. Esto generó una respuesta entre estos dos hidrocarburos muy pequeña. Por tanto, se puede decir que el diseño del liner afecta significativamente la vaporización de los componentes de la muestra.

En la figura 21 se puede observar la respuesta de relación (área n-tetracontano / área n-eicosano) variando el diseño de liner.

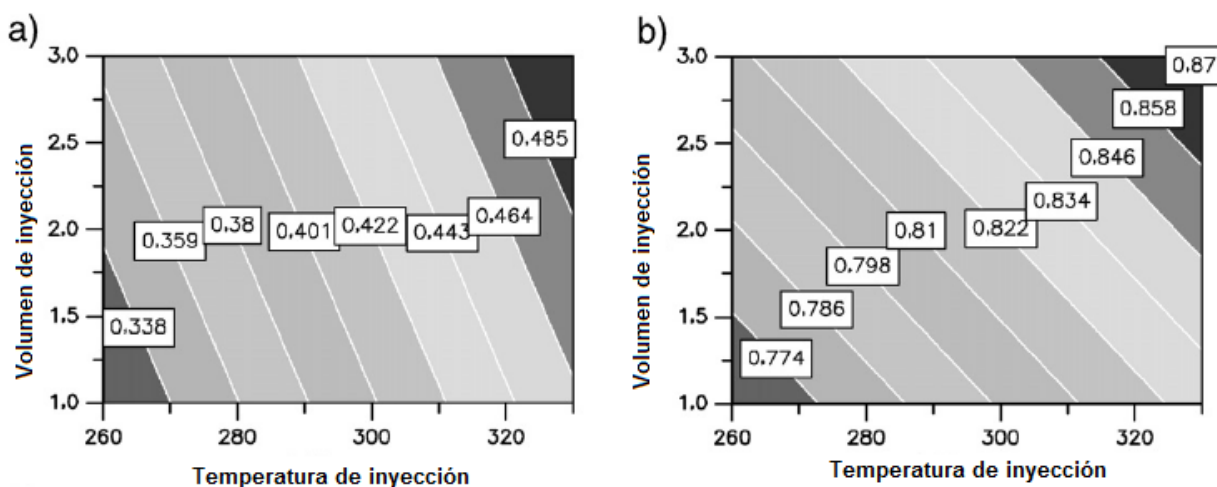


Figura 21. Respuesta de la relación n-C40 y n-C20 variando el diseño de liner. a) Sin material adsorbente. b) con material adsorbente.

Estos resultados indicaron que la variación en los ajustes del análisis cromatográfico especialmente en la configuración de inyección splitless para hidrocarburos alifáticos afecta claramente la exactitud en los resultados.

El estudio de caso analizado demuestra como se hace necesario el establecimiento de la incertidumbre de la medición variando los diferentes factores que influyen en los resultados requeridos, y así aumentar la credibilidad en los servicios analíticos [66].

CONCLUSIONES

Se documentó sobre la técnica de cromatografía de gases para el análisis de hidrocarburos alifáticos en aguas residuales. Se ratifica que una de las técnicas de extracción de mayor uso y confiabilidad es la de extracción en fase sólida. Así mismo se cercioró que la técnica de análisis de mayor uso para estos analitos es la de cromatografía de gases con detector FID.

En el presente trabajo se realizó un método para el porcentaje de recuperación de hidrocarburos alifáticos en aguas residuales por medio de la técnica de extracción en fase sólida en donde se obtuvo un porcentaje superior al 70% para los hidrocarburos alifáticos n-Heptano, n-Pentadecano y n-Dotriacontano. Es importante mejorar este en próximos estudios, cambiando condiciones de temperatura durante la extracción, y volúmenes de elución.

Se desarrolló un procedimiento para obtener la curva de calibración de los diferentes hidrocarburos alifáticos generándose un coeficiente de correlación (R^2) de 0,9995 para la curva de calibración de n-Octano, y un valor de porcentaje de desviación estándar (%RSD) de 20,87. Lo que indica que la estandarización del método es viable siguiendo este procedimiento, y mejorando algunas condiciones durante la SPE.

Se presentó un tratamiento estadístico necesario para cuando se desee estandarizar la técnica de análisis de hidrocarburos alifáticos en aguas residuales usando la técnica de cromatografía de gases. Así mismo se mostraron algunos casos de estudio en donde se determinaron las variables más influyentes como el diseño de liner en el análisis cromatográfico de hidrocarburos alifáticos usando un modelo de regresión lineal múltiple.

BIBLIOGRAFÍA

1. BENAVIDES, Joaquín; PARDO, Jenny; PERDOMO, María. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos: compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. En: NOVA-PUBLICACIÓN CIENTÍFICA ISSN: 1794-2370. Enero, 2004, Vol.2. No.2.
2. COREY, Germán. Contaminantes del agua y sus efectos en la salud. Organización panamericana de la salud. VI Núcleo técnico de sustancias en aguas superficiales. Metepec, México. Marzo. 2001. p.22-24.
3. GOBIERNO DE ESPAÑA. MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE. Impacto ambiental de los hidrocarburos y recuperación de los ecosistemas. Madrid, 2011. Disponible en: <http://www.marm.es/es/costas/temas/proteccion-del-medio-marino/la-contaminacion-marina/impacto_ambiental.aspx> (consultada el día 18 de agosto de 2011, hora: 20:00)
4. MARTIN, Carmen; GONZALES, Aldo; BLANCO, María. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. En: Revista Iberoamericana de Micología .2004; No. 21: p.103-120
5. REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL. Usos del agua y residuos líquidos. Decreto 1594 DE 1984. Publicado en diario oficial 36700 de julio 26 de 1984. Bogotá, D.C
6. GARCIA, José; TEIJÓN, José. Hidrocarburos alifáticos, aromáticos y derivados halogenados: Estructura y propiedades. 2 Ed. Albacete, España. Editorial Tébar Flores. 2006.
7. World oil demand: Asia surge drives demand back to pre-recession Levels in 2010. Edimburgo, Escocia. 2011. Consultancy group Wood Mackenzie. Disponible en: <<http://www.woodmacresearch.com/cgi-bin/wmprod/portal/corp/corpPressDetail.jsp?oid=2520004>> (consultada el día 20 de agosto de 2011)
8. WADE, Leroy. Química orgánica: Estructura y propiedades de las moléculas orgánicas. 5 Ed. Madrid: college editorial Pearson, 2007. ISBN 978-84-205-4102-0
9. Organic and inorganic solvents. Indiamart. Nueva Delhi, India. 2011. Disponible en: <<http://www.indiamart.com/alkom-chemipharm/laboratory-chemicals.html>> Consultada el día 16 de agosto de 2011. Hora: 21:00

10. MAGER, Jeanne; OSINSKY, Debra; MARKKANEN, Pia. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Propiedades de los hidrocarburos saturados y alicíclicos. 3 Ed. Madrid. No.104. p.239-241.
11. YÚFERA, Primo. Química Orgánica Básica y Aplicada: de la molécula a la industria. Barcelona, España. 1996
12. PERALT, Patricio. Contamination of waters by BTXs and processes used in the remediation of contaminated sites. En: Química Nova. 2004. Vol.27. No.3. p.p 441-446.
13. ARROYAVE, John; VILLA, Lina. Estandarización de la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización por llama para la determinación de BTEX (Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xileno) en matrices acuosas. Trabajo de grado. Pereira. Universidad Tecnológica de Pereira. Escuela de química. 2011
14. JIMENEZ, Domingo; DE LORA, Federico; SETTE, Rubens. Introduction to wastewater treatment processes. 2 Ed. London. Editorial Reverté. 2003. ISBN: 84-291-7975-5.
15. REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DEL MEDIO AMBIENTE Decreto 3930 de 2010. Publicado en diario oficial 47837 de octubre 25 de 2010. Bogotá, D.C
16. PRIETO, Vicente; MARTÍNEZ, Agustín. Contaminación de las aguas por hidrocarburos: un enfoque para abordar su estudio. En: Revista Cubana de higiene y epidemiología. Enero, 1999. No 37. p 13-20.
17. GARCIA, Carolina. Contaminación por hidrocarburos. Programa Panamericano de Defensa y Desarrollo de la Diversidad biológica, cultural y social. Tesis de Maestría ante la Universidad del País Vasco. 2005.
18. ACUÑA, Jenaro; GARCIA, Jairo; RAMIREZ, Eddy; VARGAS, José. Hidrocarburos de petróleo disueltos y dispersos, en cuatro ambientes costeros de Costa Rica. En: Revista de Biología Tropical. Diciembre, 2004. Vol. 52. ISSN 0034-7744
19. Derrame British Petroleum peor en la historia de EE.UU. Cálculos crecen. International Business Times. Mayo, 2010.
20. FISCALIA GENERAL DE LA NACIÓN. Bogotá, D.C. Mayo, 2004. Boletín de Prensa No. 177.

21. ENCICLOPEDIA DE SALUD Y SEGURIDAD EN EL TRABAJO. Propiedades de los hidrocarburos saturados y alicíclicos. Guía 104 de productos químicos. p 239-241.
22. SAN SEBASTIÁN, Miguel. Riesgos de la salud por los efectos del petróleo. Escuela nacional de salud pública. En: Businnes and economics-banking and Finance. Miami. Julio, 2005.
23. ADAMS, Randy ; MORALES, Fernando. Concentración residual de hidrocarburos en suelo del trópico. Consideraciones para la salud pública y protección al ganado. Caracas. Julio, 2008. Vol. 33. No.7. ISSN: 0378-1844.
24. TEJADA, Carlos; CASTRO, Luz; NAVARRETE, Alexander; CARDONA, Tatiana; OTERO, Luis; AFANADOR, Fernando; MOGOLLÓN, Alexander; PEDROZA, William. Panorama de la Contaminación Marina del Pacífico Colombiano: Centro Control Contaminación del Pacífico Colombiano. Ed. DIMAR. San Andrés de Tumaco. 2003. Vol. 3, 120 pp. ISBN: 958-33-5689-1
25. LAITINEN, Herbert; HARRIS, Walter. Análisis Químico: Aplicaciones de la cromatografía. 2 Ed. Barcelona, España. Editorial Reverté. ISBN-84-291-7324-2.
26. SOGORB, Miguel; VILANOVA, Eugenio. Técnicas analíticas de contaminantes químicos: Aplicaciones toxicológicas medioambientales y alimentarias. Madrid, España. Editorial Díaz de Santos. 2004. ISBN: 84-7978-662-0
27. ISAZA, Hipólito. Extracción en fase solida, fundamentación y desarrollo de aplicaciones. Pereira, Colombia: Scientia et Technica 3. 1996 .Vol.2. p.147-169. ISSN: 0122-1701
28. CASTRO, Federmán. Técnicas cromatográficas. Análisis instrumental. Universidad Tecnológica de Pereira. 2009.
29. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA EDUCACIÓN, LA CIENCIA Y LA CULTURA UNESCO. Comisión oceanográfica intergubernamental: Determinación de los hidrocarburos del petróleo en los sedimentos. Paris. 2002.
30. HUTH, Joachim. Boletín informativo de Kepler, Ingeniería y ecogestión, S.L. Técnicas de análisis de hidrocarburos. Numero 2. Septiembre de 2010.
31. SKOOG, Douglas; HOLLER, James; NIEMAN Timothy. Principios de análisis instrumental. Ed. 6. Madrid. Editorial Mcgraw-hill. 2008

32. PINTO, Luis; BONERT Christian. Origen y distribución espacial de hidrocarburos alifáticos en sedimentos de seno aysén y canal moraleda. Chile. Revista Ciencia y Tecnología del Mar. Vol. 28, No 1. Comité. 2005
33. HERNÁNDEZ, Lucas; GONZÁLES, Claudio. Introducción al análisis instrumental: Cromatografía de gases. Ed.1. Barcelona: Editorial Ariel. Cap. 11. 2002. ISBN-84-344-8043-3
34. PARREÑO, Miguel. Determinación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) en agua por cromatografía de gases. Escuela politécnica nacional. Quito 2007.
35. CENTRO REGIONAL DE ESTUDIOS Y EDUCACIÓN AMBIENTAL. Contaminación por hidrocarburos en la zona costera de la ciudad de Antofagasta. Universidad de Antofagasta. Chile. 2005
36. MCNAIR, Harold; MILLER, James. Basic Gas Chromatography. 2009. Editorial John Wiley & Sons. 2 Ed. Washington, D.C
37. MORE, Ignacio; HERNÁNDEZ, Félix. El agua en Castellón: I premi d'Investigacio Consell social. Castellón, España. Editorial Athenea. 2000. Universitat Jaume. ISBN 84-8021-333-7
38. AGIRREZABALA, L; DORRONSORO, C; FERNANDEZ, P; GARCIA, J; GÓMEZ, I. LOPEZ, M; Hydrocarbon analysis by gas chromatography of Albian samples from the Basque-Cantabrian region. Universidad Pais Vasco. Revista Geogaceta 2009. No 16. p.140-143. ISSN: 0213683X
39. HAMEL, Jaime. Determinación cromatográfica de hidrocarburos totales en aguas por microextracción en fase sólida. Universidad del Valle. Cochabamba. Departamento de Petróleo, Gas y Energías. 2004.
40. INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA. Cromatografía. Mayo, 2005. Año 2, No. 10.
41. UNDERGRADUATE INSTRUMENTATION CENTER. University of Nebraska-Lincoln. Department of chemistry. 2011. disponible en: <http://www.chem.unl.edu/uic/gc-fid.shtml> (consultada el día 20 de septiembre de 2011 Hora: 17:15)
42. BELÉN, Sofía; MOREIRA, Estrella; GUEVARA, Paulina. Análisis de hidrocarburos de petróleo en agua mediante cromatografía de gases. Departamento de ciencias de la tierra y la construcción. Ecuador.

43. LÓPEZ, Juan. Estandarización de la técnica de cromatografía de gases, acoplada a espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de metilésteres de ácidos. Universidad tecnológica de Pereira. Escuela de química 2008.
44. GALARRAGA, Federico; LABRADOR, Henry; LÓPEZ, Liliana. Estudio geoquímico de crudos del campo guafita, estado apure, VENEZUELA. ISSN 0378-1844. Revista INTERCIENCIA No. 20 p.30-36
45. DOCENCIA RU. Espectrometría de masas, tema 5, RUA Repositorio institucional de la Universidad de Alicante. España. Disponible en: <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8249/4/T5masas.pdf>. Consultada el día 21 de septiembre de 2011. Hora: 16:00
46. CHÁFER, Consuelo. Acoplamiento microextracción en fase sólida-cromatografía. Departamento de química analítica. Tesis doctoral. Universidad de valencia facultad de química. 2006
47. MILLER, JC; MILLER JN. Estadística para química analítica. Segunda edición. Estados Unidos: Addison-Wesley Iberoamericana. 1993.
48. WINEFORDNER, J.D. Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. New Jersey: Jhon Wiley & Sons, Ltd. 2003
49. ALARCÓN, Alejandro; FERRERA, Ronald; POGGI, Héctor; ROJAS, Norma. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. Revista latinoamericana de Microbiología. Vol. 48 No. 2. 2006
50. MORRIS Zief; RUTHANN Kiser. BAKER, J. Solid phase extraction for simple Preparation manual. 1994
51. TEKNOKROMA. Filtration and extraction :TK Vacuum manifolds for SPE.cap 6. 2009
52. CROMLAB. Procedimiento extracción en fase solida. Estándares certificados y materiales de referencia. Barcelona, España. 2009
53. PEÑA, Araceli; MORALES, Johanna; LABASTIDA, Carmen; CAPELLA, Santiago. Extracción en fase sólida como una alternativa para el procedimiento de limpieza en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por cromatografía de gases: aplicación a organismos marinos. DF México. 2003. Laboratorio de Cromatografía. Universidad Nacional Autónoma de México

54. PASSMAN, F; MCFARLAND, B; HILLYER M. Oxygenated gasoline biodeterioration and its control in laboratory microcosms. International Biodeterioration and Biodeg. 2001. No. 47. p. 95-106
55. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID. Área de ingeniería química. Extracción líquido-líquido. Disponible en: http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/mgilarra/experimentacionIQII/ExtraccliqLiq2006.pdf . Consultado el 15 de septiembre de 2011. Hora: 14:43
56. VALCÁRCEL Miguel, HENS Gómez. Técnicas analíticas de separación. Extracción líquido-líquido. Capítulo 8. Editorial Reverté. Barcelona, España. ISBN 84-291-7984-4
57. CIENYTECH. Science and Technology. Tabla de Miscibilidad de Disolventes. 2010.
58. ALBERO, María. Determinación de residuos de contaminantes orgánicos. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de ciencias químicas. Departamento de química analítica. 2009. ISBN: 978-84-692-2771-
59. WEI, Ming-Chi; FON, Jen. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples by microwave assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/flame ionization detection. Department of Chemistry, National Chung Hsing University. Taiwan. Enero, 2007.
60. PENA, María. Desarrollo de nuevas metodologías de preparación de muestra para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en matrices medioambientales y alimentarias. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de química. 2010
61. GILLES Roy; RENAUD; Vuillemin; GUYOMARCH; Julien. On-site determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in seawater by stirbar sorptive extraction (SBSE) and thermal desorption GC-MS. Plouzane, Francia. IFREMER. Enero, 2005.
62. COY, G.A., Protocolo. Estandarización de métodos analíticos, Bogota. Editorial I.D.E.A.M.P.F. Ambiental. 1999.
63. GOMEZ, Santiago; MORANTE, Sonia; PEREZ, Damián; SIERRA, Isabel. Análisis instrumental: Herramientas de enseñanza-aprendizaje adaptadas al espacio Europeo de educación superior. España: Gesbiblo, S.L. 2010
64. DEL HIERRO, Isabel; MORANTE, Sonia; SIERRA, Isabel. Desarrollo de métodos analíticos para la separación quiral y su aplicación al estudio de procesos

de síntesis asimétrica: Validación de métodos analíticos. Madrid. Editorial DYKINSON ,S.L. Universidad Rey Juan Carlos. 2007

65. QUATTROCCHI, O; ABELAIRA, S; LARA, R. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. 1992. Capítulo 10. Análisis cuantitativo.

66. SAARI, Eija; PERÄMÄKI, Paavo; JALONEN, Jorma. Evaluating the impact of GC operating settings on GC–FID performance for total petroleum hydrocarbon (TPH) determination. En: Microchemical Journal. Septiembre, 2010. p. 73-78.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de análisis del estándar de hidrocarburos alifáticos



110 Benner Circle
 Bellefonte, PA 16823-8812
 Tel: (800)356-1688
 Fax: (814)353-1309

Certificate of Composition

FOR LABORATORY USE ONLY-READ MSDS PRIOR TO USE.

Catalog No. : 31674 Lot No.: A073864
 Description : ASTM D2887-01 Calibration Mix, 1% wt/wt
 Expiration Date: April 2017 Storage: Room Temperature

Elution Order	Compound	CAS #	Percent Purity ²	Concentration ³ (weight/weight%)	% Uncertainty (95% C.L.; K=2) ⁴
1	n-Pentane (C5)	109-66-0	99%	0.9995 wt./wt.%	+/-0.62 %
2	n-Hexane (C6)	110-54-3	99%	0.9995 wt./wt.%	+/-0.62 %
3	n-Heptane (C7)	142-82-5	99%	0.9995 wt./wt.%	+/-0.62 %
4	n-Octane (C8)	111-65-9	99%	0.9995 wt./wt.%	+/-0.62 %
5	n-Nonane (C9)	111-84-2	99%	0.9995 wt./wt.%	+/-0.62 %
6	n-Decane (C10)	124-18-5	99%	0.9995 wt./wt.%	+/-0.62 %
7	n-Undecane (C11)	1120-21-4	99%	0.9995 wt./wt.%	+/-0.62 %
8	n-Dodecane (C12)	112-40-3	99%	0.9995 wt./wt.%	+/-0.62 %
9	n-Tetradecane (C14)	629-59-4	99%	0.9995 wt./wt.%	+/-0.62 %
10	n-Pentadecane (C15)	629-62-9	99%	0.9995 wt./wt.%	+/-0.62 %
11	n-Hexadecane (C16)	544-76-3	99%	0.9995 wt./wt.%	+/-0.62 %
12	n-Heptadecane (C17)	629-78-7	99%	0.9995 wt./wt.%	+/-0.62 %
13	n-Octadecane (C18)	593-45-3	99%	0.9995 wt./wt.%	+/-0.62 %
14	n-Eicosane (C20)	112-95-8	99%	0.9995 wt./wt.%	+/-0.62 %
15	n-Tetracosane (C24)	646-31-1	99%	0.9995 wt./wt.%	+/-0.62 %
16	n-Octacosane (C28)	630-02-4	99%	0.9995 wt./wt.%	+/-0.62 %
17	n-Dotriacontane (C32)	544-85-4	98%	0.9991 wt./wt.%	+/-0.62 %
18	n-Hexatriacontane (C36)	630-06-8	99%	0.9995 wt./wt.%	+/-0.62 %
19	n-Tetracontane (C40)	4181-95-7	97%	0.9986 wt./wt.%	+/-0.62 %
20	n-Tetratetracontane (C44)	7098-22-8	99%	0.9995 wt./wt.%	+/-0.62 %
Solvent: Carbon Disulfide		75-15-0	99%		

Column:
 30m x .25mm x .25um
 Rtx-S (cat.#10223)

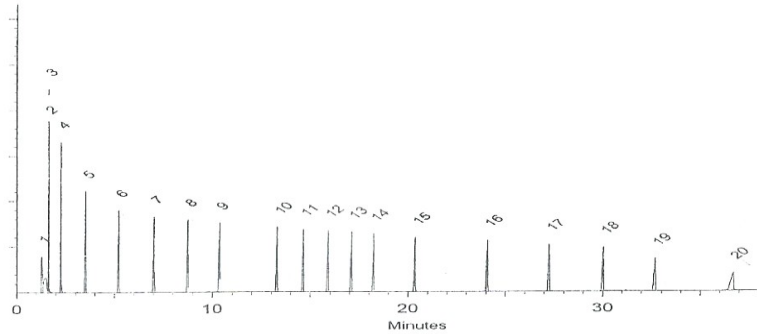
Carrier Gas:
 hydrogen-constant pressure 10 psi.

Temp. Program:
 40°C (hold 2 min.) to 330°C
 @ 10°C/min. (hold 10 min.)

Inj. Temp:
 250°C

Det. Temp:
 330°C

Det. Type:
 FID



RECEBIDO POR
 (1) 215706

Anexo 2. Cromatogramas obtenidos de la curva de calibración. El solvente usado para las diferentes concentraciones es pentano.

Cromatograma Patrón 100 ppm

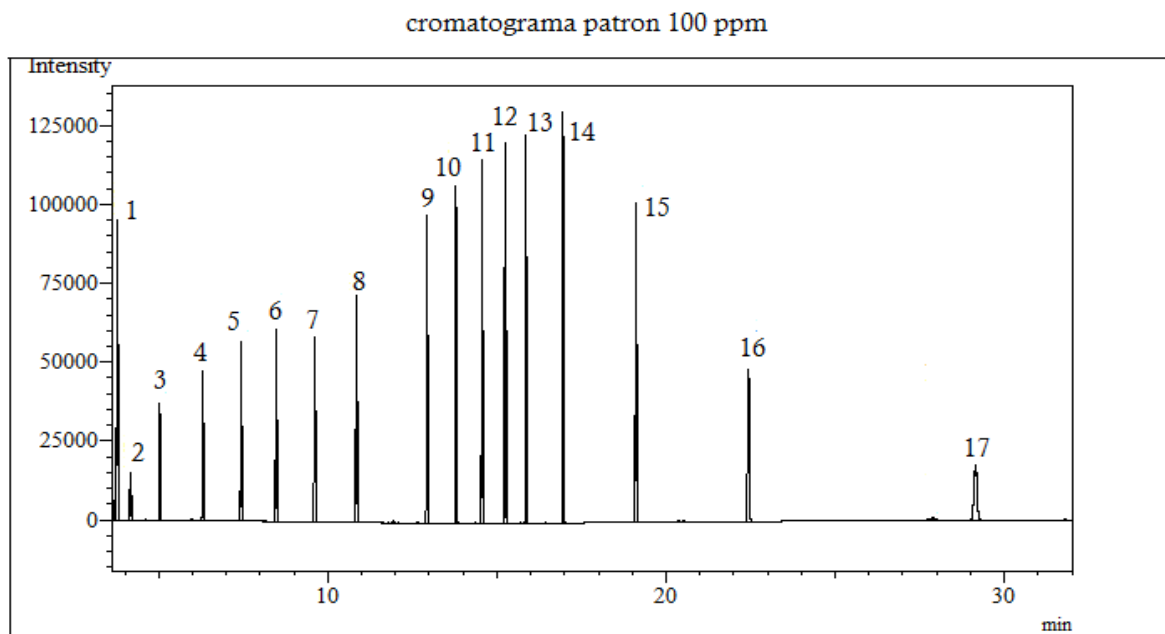


Figura 22. Cromatograma patrón 100 ppm de hidrocarburos alifáticos

Cromatograma patrón 40 ppm

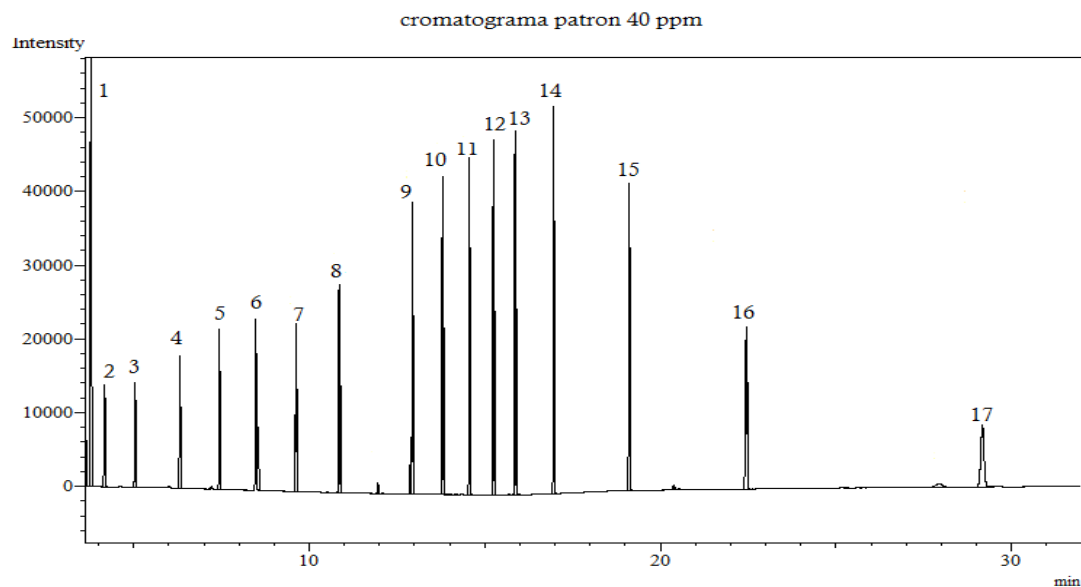


Figura 23. Cromatograma patrón 40 ppm de hidrocarburos alifáticos

Cromatograma patrón 10 ppm

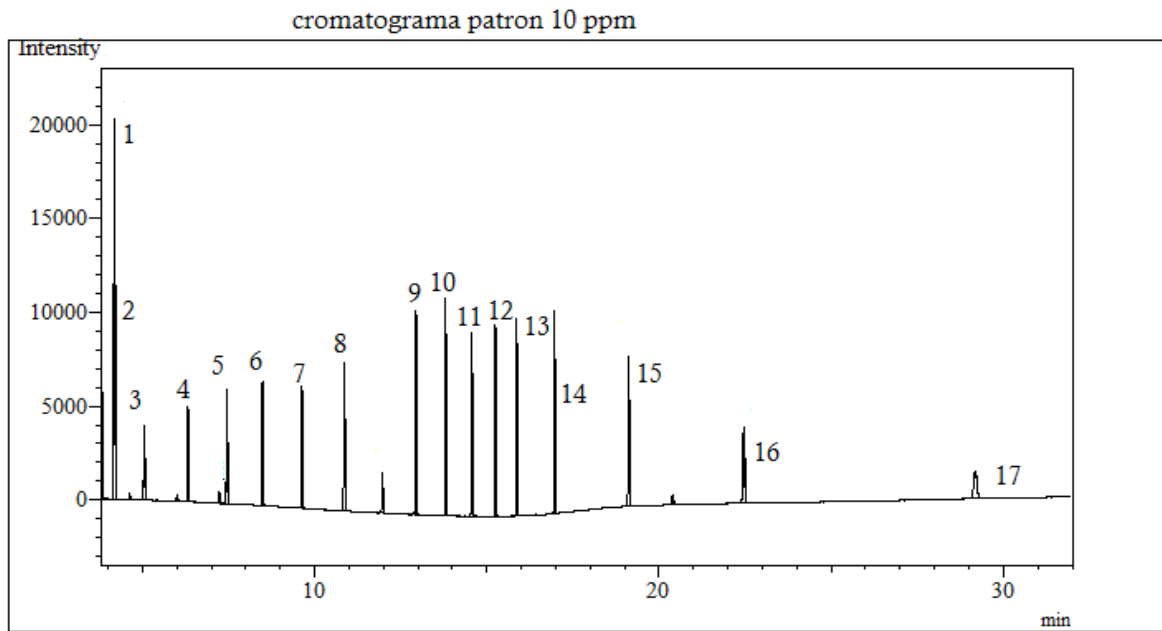


Figura 24. Cromatograma patrón 10 ppm de hidrocarburos alifáticos

Cromatograma patrón 7 ppm

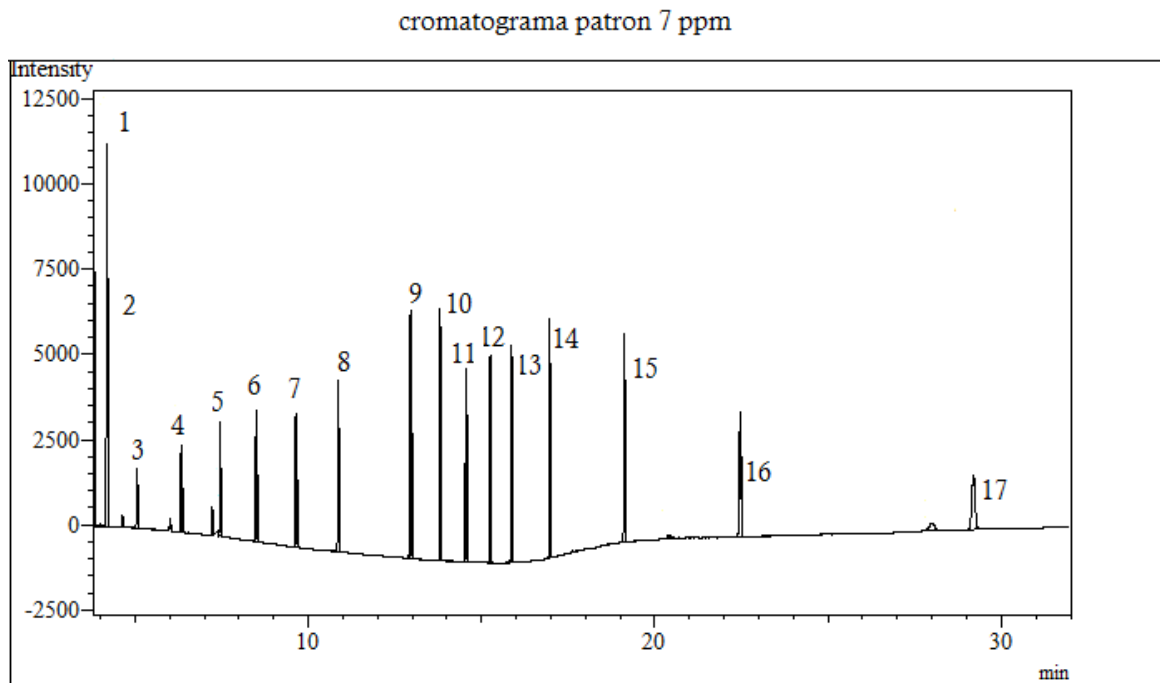


Figura 25. Cromatograma patrón 7 ppm de hidrocarburos alifáticos

Cromatograma patrón 4 ppm

cromatograma patron 4 ppm

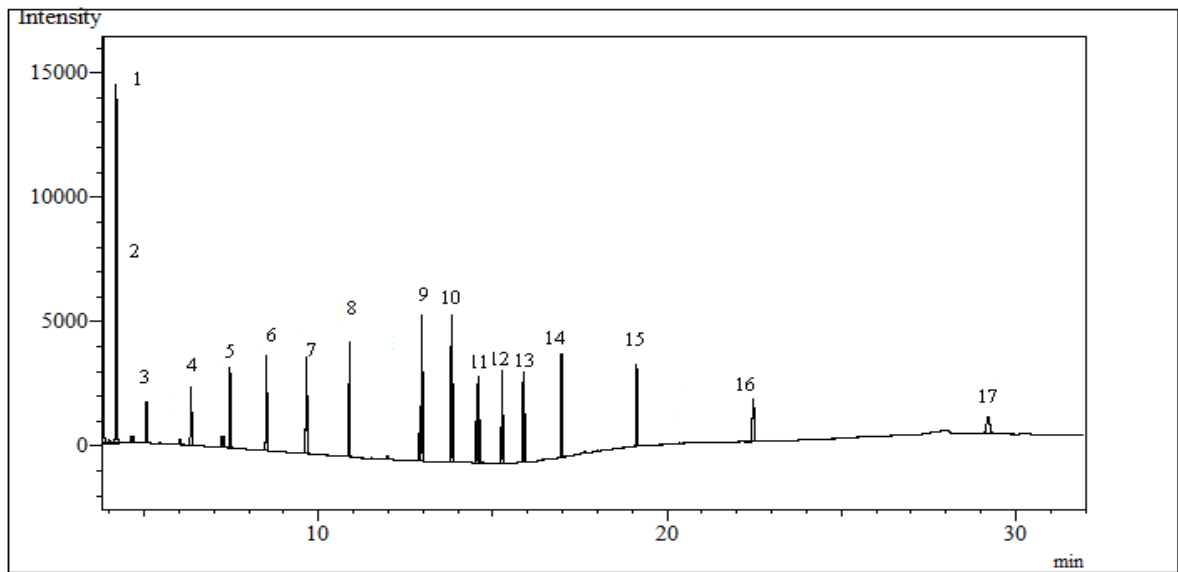


Figura 26. Cromatograma patrón 4 ppm de hidrocarburos alifáticos

Cromatograma patrón 1 ppm

Cromatograma Patrón 1 ppm

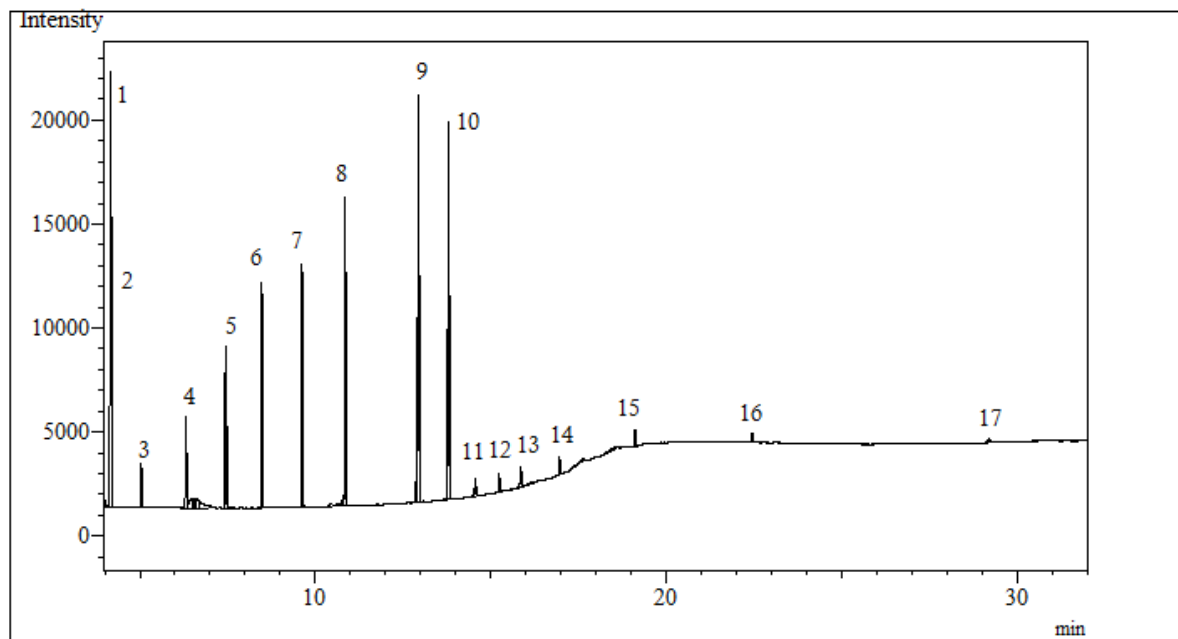


Figura 27. Cromatograma patrón 1 ppm de hidrocarburos alifáticos

Cromatograma patrón 0,7 ppm

cromatograma Patron 0,7 ppm

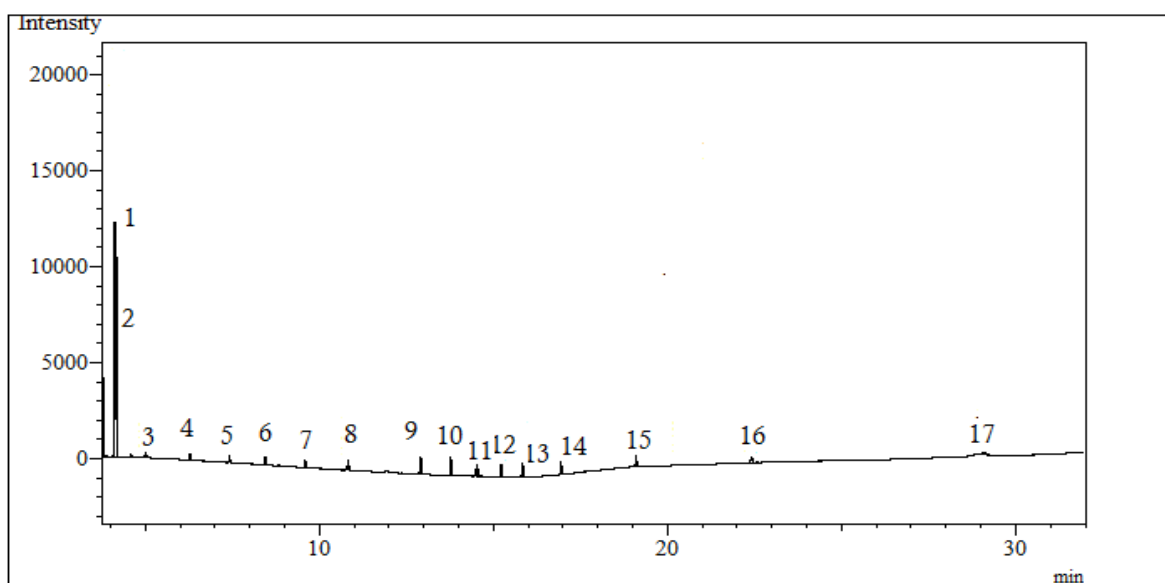


Figura 28. Cromatograma patrón 0.7 ppm de hidrocarburos alifáticos

Cromatograma Patrón 0,1 ppm

cromatograma 0,1 ppm

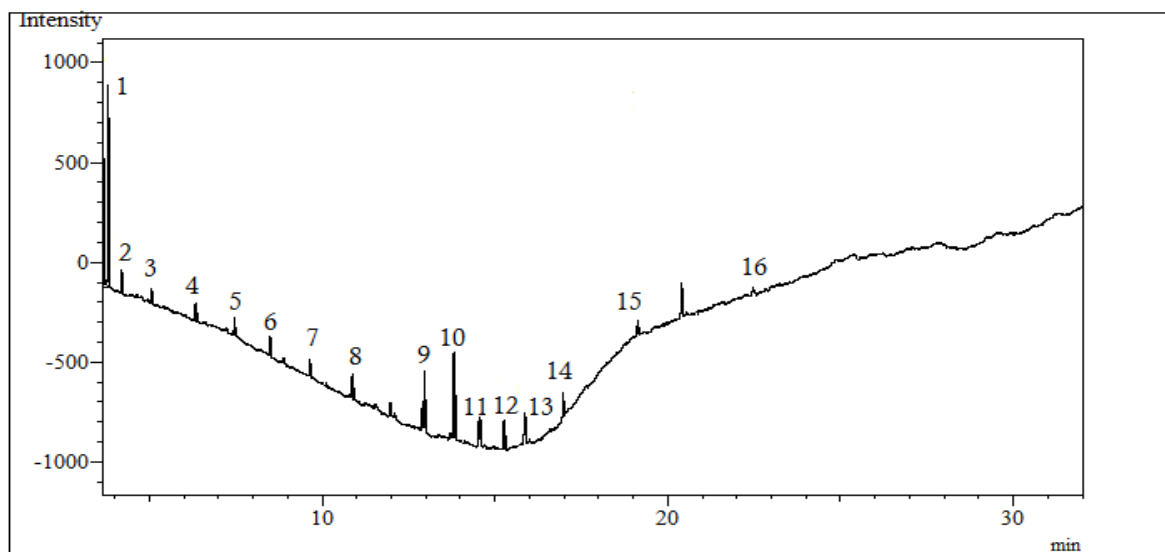


Figura 29. Cromatograma patrón 0.1 ppm de hidrocarburos alifáticos