

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICA
ESCUELA DE QUIMICA



**MICROEXTRACCION EN FASE SOLIDA Y CROMATOGRAFIA DE
GASES (GC-FID) PARA LA DETERMINACION DE BENCENO, TOLUENO,
ETILBENCENO Y XILENOS EN MUESTRAS DE AGUA DEL GOLFO DE
FONSECA.**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:
ANA ELSI ALFARO ROMERO**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADA EN CIENCIAS QUIMICAS**

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, JUNIO DE 2008

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICA
ESCUELA DE QUIMICA**

**“MICROEXTRACCION EN FASE SOLIDA Y CROMATOGRAFIA DE
GASES (GC-FID) PARA LA DETERMINACION DE BENCENO, TOLUENO,
ETILBENCENO Y XILENOS (BTEX) EN MUESTRAS DE AGUA DEL
GOLFO DE FONSECA.”**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:
ANA ELSI ALFARO ROMERO**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADA EN CIENCIAS QUIMICAS**

**ASESOR:
DR. NESTOR GUILLERMO ORELLANA VELADO**

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, JUNIO DE 2008

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

Ing RUFINO ANTONIO QUEZADA SANCHEZ

SECRETARIO GENERAL

Lic. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHAVEZ

FISCAL

Dr. RENE MADECADEL PERLA JIMENEZ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÀTICA

DECANO

Dr. RAFAEL ANTONIO GOMEZ ESCOTO

DIRECTOR DE LA ESCUELA DE QUÌMICA

Lic. JOSE ALFREDO DIAZ

AGRADECIMIENTOS

**AL INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA DE EL
SALVADOR (ICMARES)**

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todo Poderoso.

*A mi asesor por su disposición y apoyo incondicional
En el desarrollo, elaboración y finalización de éste trabajo.*

*A mis padres y hermanos por ser los que siempre me han motivado en la búsqueda de
mis logros.*

INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS.....	I
INDICE DE TABLAS	III
RESUMEN	IV
INTRODUCCION	V
OBJETIVOS	VI
1.0 FUNDAMENTO TEORICO	1
1.1 TOXICIDAD DE BENCENO, TOLUENO, ETILBENCENO Y XILENOS (BTX).....	2
1.2 DEGRADACION DE CONTAMINANTES.	6
1.2.1 MECANISMOS BIOTICOS DE DEGRADACION DE CONTAMINANTES.	7
1.2.2 BIODEGRADACION DE HIDROCARBUROS AROMATICOS.	8
1.2.3 MECANISMOS ABIOTICOS DE DEGRADACION DE CONTAMINANTES.	9
1.3 FUENTES DE BTEX EN EL MEDIO AMBIENTE MARINO	9
1.4 METODOS PARA LA DETERMINACION DE BTEX ⁽³⁾	10
1.4.1 INTRODUCCION A LA CROMATOLOGRAFIA.	11
1.4.2 MICROEXTRACCION EN FASE SOLIDA (SPME).....	13
1.4.2.1 EQUILIBRIO DE DISTRIBUCION ENTRE LAS FASES DEL SISTEMA	13
1.4.2.2 TIPOS DE EXTRACCION CON LA FIBRA DE SPME.....	14
1.4.3 INTERFERENCIAS DEL METODO	15
1.4.3.1 FACTORES QUE AFECTAN LA ADSORCIÓN Y DESORCIÓN EN MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CON ESPACIO DE CABEZA HS-SPME.....	15
1.5 VALIDACION DEL METODO.....	17
1.5.1 LINEALIDAD.....	17
1.5.2 PRECISION.....	19
1.5.2.1 REPETIBILIDAD Y SENSIBILIDAD.....	19
1.5.2.2 REPRODUCIBILIDAD.....	20
1.5.3 EXACTITUD.....	20
1.5.4 LIMITE DE DETECCION Y LIMITE DE CUANTIFICACION.....	20
2.0 PARTE EXPERIMENTAL	22
2.1 METODOLOGIA	22

2.1.1 OPTIMIZACION DE PARAMETROS	22
2.2 TOMA DE MUESTRAS	22
2.3 ANALISIS DE LAS MUESTRAS	24
2.3.1 DESCRIPCION DEL METODO	25
2.3.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	26
2.3.3 EQUIPO DE LABORATORIO, REACTIVOS Y MATERIAL.....	26
2.4 CUANTIFICACION DE BTX EN MUESTRAS DE AGUA MARINA	27
2.5 PROPIEDADES ANALITICAS DEL MÉTODO.....	27
2.5.1 LINEALIDAD	27
2.5.2 REPETIBILIDAD.....	28
2.5.3 REPRODUCIBILIDAD	28
2.5.4 LIMITE DE DETECCION Y DE CUANTIFICACION.....	29
2.5.5 EXACTITUD DEL METODO.....	29
3.0 DISCUSION Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS	30
3.1 OPTIMIZACION DEL METODO DE EXTRACCION DE ANALITOS DE LA MUESTRA Y PARAMETROS DEL PROGRAMA CROMATOGRAFICO.....	30
3.1.1 OPTIMIZACION DE TEMPERATURA Y TIEMPO DE ADSORCION DE BTX EN LA FIBRA DE MICROEXTRACCION EN FASE SOLIDA.	30
3.1.2 OPTIMIZACION DE TIEMPO Y TEMPERATURA DE DESORCION DE BTX DE LA FIBRA DE MICROEXTRACCION EN FASE SÓLIDA.	33
3.1.3 OPTIMIZACION DE TEMPERATURAS EN EL PROGRAMA CROMATOGRÁFICO.....	34
3.2 LINEALIDAD	35
3.3 REPETIBILIDAD DEL METODO.....	37
3.3.1 ANALISIS DE VARIANZA ANOVA.....	42
3.4 LIMITE DE DETECCION Y LIMITE DE CUANTIFICACION	44
3.5 EXACTITUD.....	45
3.6 CUANTIFICACION DE BTX EN MUESTRAS DE AGUA MARINA	47
3.6.1 PRIMER MUESTREO	50
3.6.2 SEGUNDO MUESTREO	51
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
CONCLUSIONES	55
RECOMENDACIONES.....	57
BIBLIOGRAFIA	58

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Metabolismo Intermediario de Benceno ⁽¹⁰⁾	3
Figura 1.2 Mecanismos posibles para Cu (II)-mediado por ADN dañado inducido por metabolitos de tolueno en presencia de NADH ⁽¹⁾	5
Figura 1.3 Pasos generalizados para la degradación de los BTEX ⁽⁴²⁾	8
Figura 1.4 Fibra en muestra líquida y equilibrio de fase ⁽⁸⁾	13
Figura 1.5 En a) SPME con espacio de cabeza y en b) SPME directa.....	14
Figura 1.6 En a) Adsorción y en b) Desorción.....	15
Figura 2.1 Puntos de muestreo en el área del Golfo de Fonseca.....	23
Figura 2.2 Dispositivo para la toma de muestras.....	24
Figura 3.1 Efecto de la temperatura de la muestra sobre la adsorción de BTX en la fibra de SPME.....	31
Figura 3.2 Efecto del tiempo de exposición de la fibra en el volumen gaseoso del vial de la muestra sobre la adsorción de BTX en la fibra de SPME.....	32
Figura 3.3 Efecto del tiempo de exposición de fibra en el inyector sobre la desorción de BTX.....	33
Figura 3.4 Efecto de la temperatura en el inyector del cromatógrafo de gases sobre la desorción de BTX.....	34
Figura 3.5 Curva de calibración para linealidad de Benceno, Tolueno y Xilenos...36	
Figura 3.6 Curva de calibración de benceno (día 1).....	38
Figura 3.7 Curva de calibración de benceno (día 2).....	38
Figura 3.8 Curva de calibración de benceno (día 3).....	38
Figura 3.9 Curva de calibración de tolueno (día 1).....	39
Figura 3.10 Curva de calibración de tolueno (día 2).....	40
Figura 3.11 Curva de calibración de tolueno (día 3).....	40
Figura 3.12 Curva de calibración de xilenos (día 1).....	41
Figura 3.13 Curva de calibración de xilenos (día 2).....	41
Figura 3.14 Curva de calibración de xilenos (día 3).....	41
Figura 3.15 Curvas de calibración de BTX para determinar exactitud.....	46

Figura 3.16 Curva de calibración para determinación de las concentraciones de Benceno, Tolueno y Xilenos. (Primer muestreo).....	50
Figura 3.17 Curva de calibración para determinar las concentraciones de Benceno, Tolueno y Xilenos. (Segundo muestreo).....	51
Figura 3.18 Cromatograma del punto de muestreo ubicado en el estero ramaditas...	53
Figura 3.19 Cromatograma del punto de muestreo ubicado en las cercanías del estero Chapernal (Los jotes).....	53
Figura 3.20 Cromatograma del punto de muestreo ubicado en La Playa El Tamarindo.....	54

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Procesos que intervienen en la atenuación natural de contaminantes	6
Tabla 3.1 Efecto de la temperatura de la muestra sobre la adsorción de los analitos en la fibra.	31
Tabla 3.2 Efecto del tiempo de exposición de la fibra en el volumen gaseoso sobre la adsorción de BTX en la fibra.	32
Tabla 3.3 Efecto del tiempo de exposición de la fibra en el inyector sobre la desorción de btx.	33
Tabla 3.4 efecto de la temperatura del inyector sobre la desorción de BTX.	34
TABLA 3.5 RESULTADOS DE CURVA DE CALIBRACION PARA LINEALIDAD (BENCENO).....	35
TABLA 3.6 RESULTADOS DE CURVA DE CALIBRACION PARA LINEALIDAD (TOLUENO).....	35
TABLA 3.7 RESULTADOS DE CURVA DE CALIBRACION PARA LINEALIDAD (XILENOS)	36
Tabla 3.8 Resultados de las curvas de calibración (1), (2) y (3) de benceno.....	37
Tabla 3.9 Resultados de las curvas de calibración (1), (2) y (3) de tolueno.....	39
Tabla 3.10 Resultados de las curvas de calibración (1), (2) y (3) de xilenos.	40
TABLA 3.11 Analisis de varianza de las curvas de calibración (1), (2) y (3) de benceno.	43
TABLA 3.12 ANALISIS DE VARIANZA DE LAS CURVAS DE CALIBRACION (1), (2) Y (3) DE TOLUENO.	43
TABLA 3.13 Analisis de varianza de las curvas de calibración (1), (2) y (3) de xilenos.	44
Tabla 3.14 Calculos del Limite de Detección y Limite de Cuantificación.....	45
Tabla 3.15 Datos de curva de calibración para la determinación de exactitud.....	46
Tabla 3.17 Resultados de pH, conductividad, temperatura, salinidad y oxígeno disuelto.....	49
Tabla 3.18 Resultados de concentraciones de benceno, tolueno y xilenos (PRIMER Y SEGUNDO MUESTREO).....	52

RESUMEN

El Golfo de Fonseca tiene gran importancia socio-económica en El Salvador; la pesca y la obtención de productos marinos son básicos para la alimentación y comercialización de los habitantes, sin embargo, en el entrante marítimo se depositan efluentes domésticos, desechos industriales y de minería que pueden afectar la vida acuática ⁽²²⁾.

En este trabajo se determinó la concentración de benceno, tolueno y xilenos (BTX) en agua marina del Golfo de Fonseca ubicado en el departamento de La Unión, utilizando el método 8260B de Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods de la Agencia de Protección Ambiental Estadounidense (EPA) ⁽⁹⁾, con el objetivo de establecer una línea base en el estudio de los mismos.

Los BTEX son contaminantes derivados del petróleo ampliamente estudiados y clasificados de alta toxicidad que aun en millonésimas de gramo por litro son tóxicos; se caracterizan por ser medianamente solubles en agua ^(4, 21), lo que permite la transferencia de los mismos al agua marina ⁽³⁾.

Se determinaron las propiedades analíticas del método por medio de los parámetros de validación en las condiciones de trabajo del laboratorio, asegurando de esta forma que los resultados obtenidos son fiables.

Los análisis de BTX se realizaron para 18 puntos de muestreo ubicados en El Golfo de Fonseca, los resultados de concentraciones de los analitos se encuentran entre el límite de detección y el límite de cuantificación, tomando en cuenta que este estudio se realizó en época de lluvia.

INTRODUCCION

El estudio realizado es de tipo exploratorio en la determinación de la contaminación del Golfo de Fonseca, específicamente de los contaminantes orgánicos tóxicos: benceno, tolueno y xilenos, utilizando la técnica de Microextracción en Fase Sólida y Cromatografía de Gases con detector de Ionización de Llama.

Se estudió la presencia de benceno, tolueno y xilenos (BTX), como parte de las actividades del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de El Salvador (ICMARES) que incluye dentro de sus objetivos, estudiar la contaminación de los ambientes marino-costeros del país para proponer acciones de mitigación, disminución y reversión de estos procesos.

El desarrollo del trabajo de investigación en resumen comprende las siguientes etapas: Optimización de parámetros del programa cromatográfico y parámetros de la técnica de introducción de analitos, validación del método 8260B de la Agencia de Protección Ambiental Estadounidense EPA ⁽⁹⁾, elección de la zona de muestreo y planificación de muestreos, toma de muestras, análisis de las muestras, correlación de resultados de la validación con los análisis realizados en los puntos de muestreo.

Finalmente se determinó las concentraciones de BTX en agua superficial del Golfo de Fonseca utilizando el método 8260B de la Agencia de Protección Ambiental Estadounidense EPA ⁽⁹⁾ “Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass spectrometry (GC/MS)” y se encontró resultados de concentraciones de analitos entre el límite de detección y el límite de cuantificación, sin embargo es necesario hacer muestreos en época de verano ya que este estudio se realizó en época de invierno.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar benceno, tolueno y xilenos (BTX) en muestras de agua del Golfo de Fonseca utilizando Microextracción en Fase Sólida (SPME) y Cromatografía de Gases (GC-FID), mediante el método 8260B de Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods de la Agencia de Protección Ambiental Estadounidense EPA ⁽⁹⁾

Objetivos Específicos

- Optimizar el proceso de adsorción de BTX y su posterior desorción (en el cromatógrafo de gases) utilizando una Fibra de Microextracción en Fase Sólida (SPME).
- Validar la metodología para la determinación de BTX en muestras de agua de origen marino del departamento de la Unión. Método 8260B de Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods de la Agencia de Protección Ambiental Estadounidense EPA ⁽⁹⁾.
- Realizar muestreos de agua superficial en el Golfo de Fonseca, en la región perteneciente a El Salvador.
- Determinar la concentración de BTX en muestras de agua del Golfo de Fonseca utilizando Microextracción en Fase Sólida (SPME) y Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de Llama (GC-FID).
- Aplicar la metodología validada en la determinación de la concentración de BTX a las muestras de aguas recolectadas, provenientes de las zonas seleccionadas.

1.0 FUNDAMENTO TEORICO

La contaminación del medio ambiente por hidrocarburos del petróleo (PHCs) es extensa y frecuente. El crudo y aceites refinados son accidental o intencionalmente lanzados desde buques cisternas, accidentes de transporte de tanques, escapes, tanques de almacenaje y durante la transferencia de estos productos.

En la actualidad las regulaciones reconocen que la presencia de contaminación por derivados del petróleo ha representado un incremento de riesgo para la salud humana y el medio ambiente⁽²⁾.

Los productos de petróleo en general son mezclas complejas de hidrocarburos que pueden contener metales pesados como Pb, V, Ni, Co, Fe.

Se reconocen dos grandes grupos de hidrocarburos:

- a) Los hidrocarburos alifáticos, son sustancias de cadenas abiertas o cíclicas (alcanos, alquenos, alquinos y alifáticos cíclicos)
- b) Los hidrocarburos aromáticos, son aquellos cuya base estructural es el anillo bencénico y dependiendo del número de anillos pueden ser monoaromáticos, incluyendo la mezcla BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos) y los hidrocarburos policíclicos como naftaleno, antraceno y otros.

La Administración Nacional de los Océanos y la Atmósfera (NOAA, www.noaa.gov) da como referencia la concentración de 0.7 mg/L de benceno, para producir efectos crónicos como criterio de calidad de agua de mar⁽⁴¹⁾.

El benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX) son contaminantes orgánicos derivados del petróleo considerados de alta toxicidad⁽⁴⁾ usados como disolventes industriales, para la producción de diferentes mercancías y han sido clasificados como contaminantes prioritarios por la Administración de Protección Ambiental de Estados Unidos (US-EPA), debido a que aún en concentraciones de millonésimas de gramo por litro son tóxicos⁽³⁾.

1.1 TOXICIDAD DE BENCENO, TOLUENO, ETILBENCENO Y XILENOS (BTX).

BENCENO.

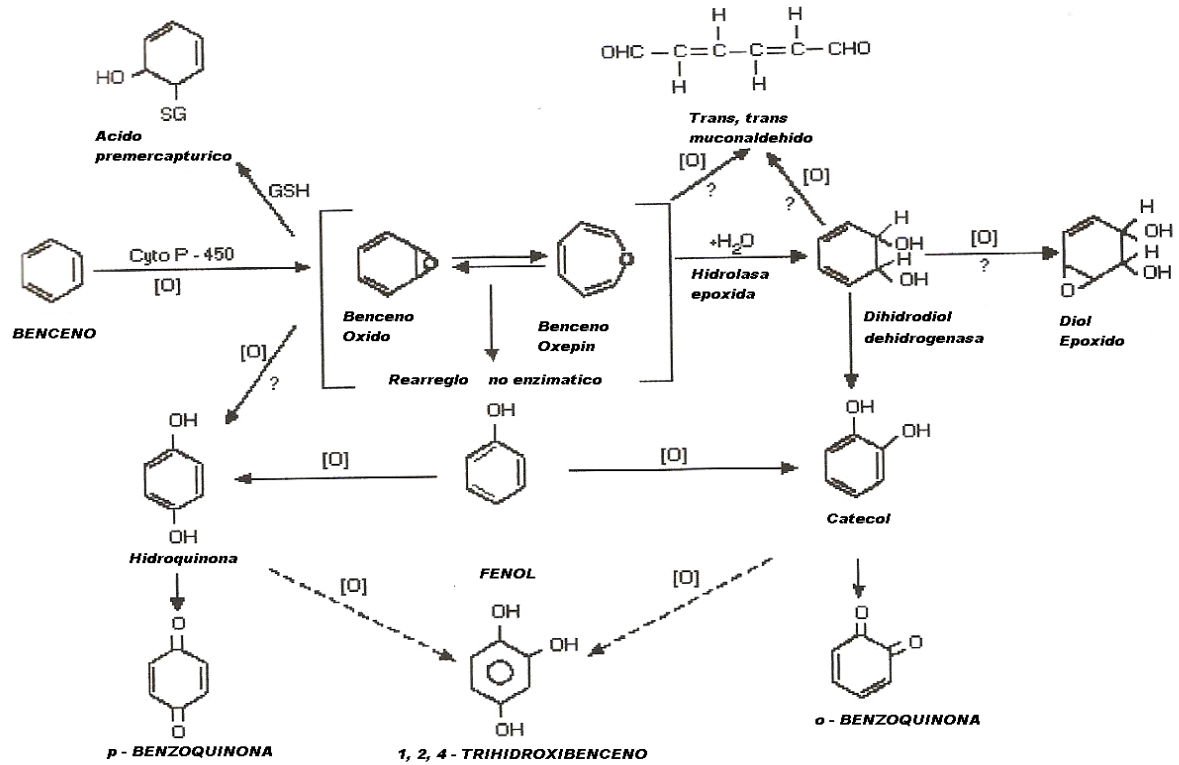
En humanos la exposición a altas concentraciones de benceno afecta el sistema nervioso central. A concentraciones altas, es tóxico para el sistema hematopoyético y causa cambios hematológicos, incluyendo leucemia. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado el benceno como carcinogénico para los humanos^(3,10).

El benceno tiene varios efectos perjudiciales para la salud, se destaca por producir depresión en la médula ósea, que conduce a la anemia aplásica⁽⁵⁾, además aumenta los riesgos de cáncer linfohematopoyético maligno y gastrointestinal⁽¹⁾. Niveles altos de exposición hacen probable una elevada incidencia de esas enfermedades.

La tendencia del benceno a acumularse en los tejidos que contienen gran cantidad de lípidos permite que atraviese la placenta provocando daños al feto, por esta razón se acumula con mayor facilidad en las mujeres, ya que el contenido de grasa corporal es mayor que en los hombres⁽⁵⁾

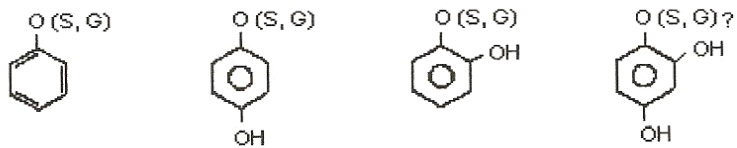
Uno de los metabolitos principales del benceno en el organismo es benzoquinona, sin embargo se ha encontrado hidroquinona (HQ) y 1, 4 Benzoquinona de los cuales se derivan metilhidroquinona (MQH) y metilbenzoquinona MBQ Fig 1.1, de estos, el último, es mas dañino⁽¹⁾.

Figura 1.1 Metabolismo Intermediario de Benceno⁽¹⁰⁾.

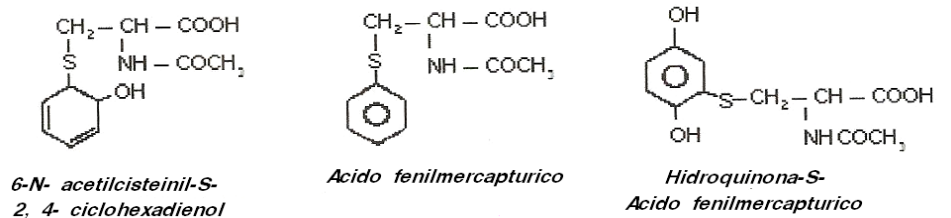


Metabolitos urinarios de benceno

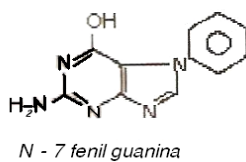
Glucoronida y sulfatos conjugados



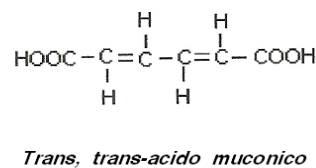
Acidos Mercaptuicos



DNA-BASES ADUCTOS (S)



METABOLITOS ABIERTOS (S)



TOLUENO.

Recientemente se ha descubierto que el tolueno tiene poder carcinogénico y su toxicidad potencial en la reproducción durante el embarazo ha estado en aumento. Entre los metabolitos derivados del tolueno está la benzoquinona, los de mayor y menor rendimiento metabólico que se ilustran en la Fig. 1.2, pero se han investigado los efectos que producen los metabolitos de menor rendimiento por que tienen mayor relevancia en cuanto a la toxicidad, metilhidroquinona y metilbenzoquinona de los cuales, el que provoca mayores efectos es la metilbenzoquinona ⁽¹⁾.

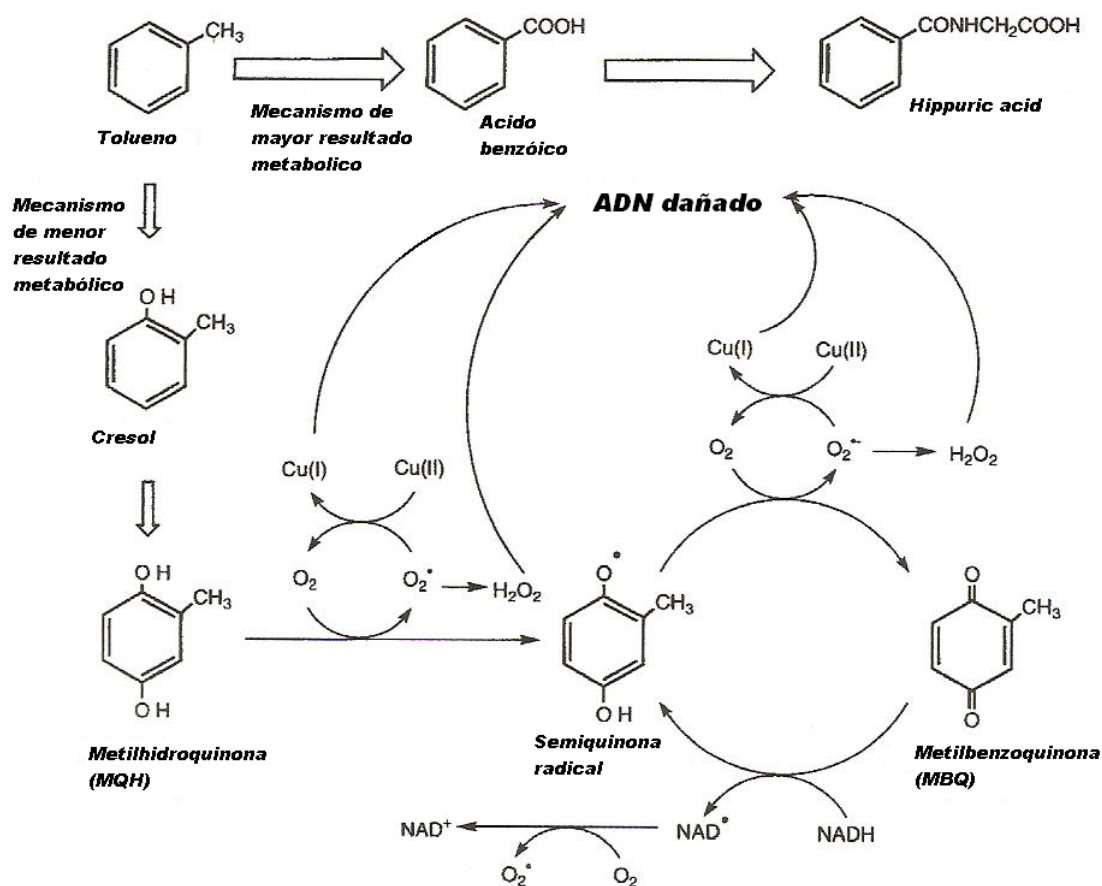
La generación de metabolitos a partir del tolueno se ve incrementada cuando hay presencia de Cu (II) y NADH (dinucleótido de nicotinamida y adenina), en el proceso metabólico se detectó O₂ y radicales libres de semiquinona que intervienen en la formación de metilbenzoquinona ⁽¹⁾, En la figura 1.2 se presentan los mecanismos posibles de interacción entre Cu II y ADN dañado, inducido por metabolitos de tolueno en presencia de NADH.

Los resultados sugieren que estos metabolitos pueden jugar algunos roles en la formación de cáncer y toxicidad en la reproducción durante el embarazo, sin embargo el tolueno es muy usado como solvente en pinturas e industria química y mezcla de agentes en gasolina⁽¹⁾.

La Agencia Internacional para la investigación del cáncer (IARC), sobre la base de estudios recientes de componentes cancerígenos ha revelado el incremento de riesgos de varios tipos de cáncer en humanos expuestos a tolueno. En experimentos de carcinogenicidad con adición a largo termino, se ha concluido que el tolueno es carcinogénico para ratas. Varios estudios presentan genotoxicidad en humanos y roedores expuestos al tolueno. Además se observó, en estudios de personas expuestas a tolueno, cáncer en el tracto respiratorio y se ha concluido que el tolueno tiene toxicidad potencial reproductiva⁽¹⁾.

En cuanto a estudios metabólicos, estos demuestran que el tolueno es en parte metabolizado a cresol y el cresol es hidroxilado para formar metilhidroquinona (MQH); la oxidación espontánea de MQH produce metilbenzoquinona (MBQ) de la cual ya hemos mencionado la toxicidad que presenta. Relevantemente el cresol es conocido por tener actividad en la promoción de tumores.

Figura 1.2 Mecanismos posibles para Cu (II)-mediado por ADN dañado inducido por metabolitos de tolueno en presencia de NADH⁽¹⁾.



ETILBENCENO Y XILENOS.

Aún no se puede comprobar su toxicidad, pero se relaciona con teratogenicidad o deformaciones monstruosas en fetos. Por esta razón, en la actualidad son objeto de estudio⁽³⁾.

Aunque no se puede comprobar la toxicidad del etilbenceno y los xilenos; estos tienen cierto grado de solubilidad que permite la transferencia al agua marina por efluentes industriales y contaminación atmosférica principalmente por las emisiones vehiculares y son considerados como contaminantes prioritarios por la Administración de Protección Medioambiental de Estados Unidos (US-EPA)⁽³⁾; además, la actividad marítima no controlada permite el aumento de la contaminación por medio de vertidos de residuos oleosos.

1.2 DEGRADACION DE CONTAMINANTES.

Los procesos físicos, químicos y biológicos que intervienen en el transporte de los contaminantes en el medio y que contribuyen a la atenuación natural de los contaminantes en suelos y aguas son:

Procesos no destructivos: Son los que **reducen la concentración** de los contaminantes, (Dispersión, adsorción, dilución, volatilización.)

Procesos destructivos: Son los que **reducen la masa total del contaminante.** (Degradación abiótica y biodegradación.), Tabla 1.1.

De los procesos destructivos y no destructivos el más importante es la biodegradación, mecanismo que actúa en la disminución destructiva de los contaminantes más comunes en el medio, esto depende del tipo de contaminante y de la disponibilidad de componentes que ceden electrones o fuentes que proporcionan carbono (hidrocarburos, clorobenzenos, etenos, y algunos etanos clorados.).

La biodegradación tanto aerobia como anaerobia está limitada por la tasa de suministro de aceptores de electrones (oxígeno disuelto, nitrato, manganeso IV, hierro III, sulfato, dióxido de carbono y otros) y no por la tasa de utilización de estos por los microorganismos y por medio de la degradación aerobia se consume todo el oxígeno disponible llevando a condiciones anaerobias la zona de contaminación.

TABLA 1.1 PROCESOS QUE INTERVIENEN EN LA ATENUACIÓN NATURAL DE CONTAMINANTES

Procesos destructivos	Descripción	Dependencias	Efecto
Biodegradación	Reacciones de oxidación y reducción por microorganismos que degradan los contaminantes.	Población microbiológica y propiedades de los contaminantes. Puede ser degradación anaerobia o aerobia.	Puede degradar completamente los contaminantes. (Reducción de la masa del contaminante en el medio.
Degradación abiótica	Transformación química sin intervención de microorganismos.	Depende de las propiedades de los contaminantes y de las características de las aguas.	Puede degradar completa o parcialmente los contaminantes. Es inferior a la biodegradación.

1.2.1 MECANISMOS BIOTICOS DE DEGRADACION DE CONTAMINANTES

La biodegradación es la transformación completa de un contaminante en productos finales no nocivos (CO_2 , H_2O , metano y sales) por medio de la metabolización llevada a cabo por los microorganismos. En algunos casos, la actividad metabólica cambia solo la forma química del contaminante sin finalizar en su mineralización, este proceso se llama **biotransformación** ⁽²⁴⁾.

Los procesos de biodegradación son complejos y esto se fundamenta en:

- La diversidad de microorganismos que intervienen en ellos.
- La variedad de procesos metabólicos que pueden ocurrir por tres mecanismos:
 - Utilizando el sustrato como primario para el crecimiento (cede electrones)
 - Utilización del contaminante como aceptor de electrones.
 - Cometabolismo ⁽²⁴⁾.

Los mecanismos que involucran componentes que ceden (sustrato primario) y aceptan electrones, implican la transferencia de los mismos en condiciones aerobias y anaerobias. Los donadores de electrones incluyen compuestos orgánicos naturales, hidrocarburos, clorobenzenos, etenos y algunos etanos clorados. Los aceptores de electrones pueden ser oxígeno disuelto, nitrato, manganeso (IV), hierro (III), sulfato, dióxido de carbono y otros. Bajo condiciones aerobias el oxígeno disuelto es el aceptor final de electrones durante la respiración aerobia ⁽²⁴⁾.

El cometabolismo es un proceso mediante el cual el microorganismo no obtiene ningún beneficio durante la biodegradación del contaminante ya que la degradación se debe a una reacción entre el contaminante y las enzimas que se producen en la degradación de otro compuesto orgánico que no es el contaminante ⁽²⁴⁾.

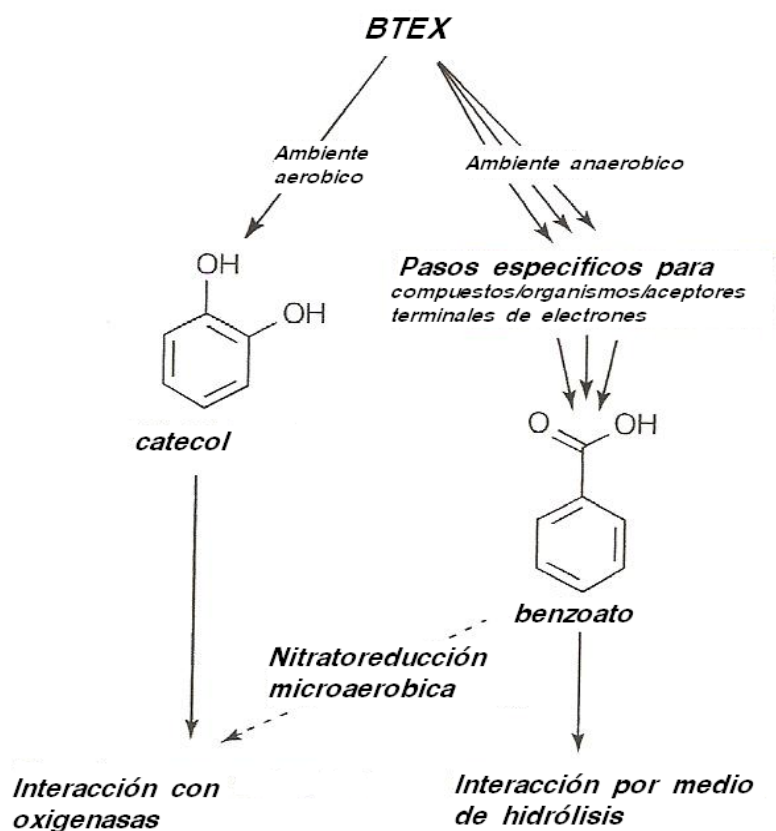
Algunos cambios químicos que ocurren en la biodegradación, en sistemas aerobios durante la respiración son los siguientes: El oxígeno se reduce a agua, las concentraciones de oxígeno disuelto en las aguas decrece y la alcalinidad aumenta ⁽²⁴⁾.

También la contaminación por hidrocarburos de petróleo decrece mediante los procesos de respiración aerobia, desnitrificación, reducción de manganeso (IV), reducción de hierro (III) y metanogénesis ⁽²⁴⁾.

1.2.2 BIODEGRADACION DE HIDROCARBUROS AROMATICOS.

Varios compuestos aromáticos están presentes en el petróleo, incluyendo compuestos de uno a cinco anillos aromáticos alquil-sustituídos. Los compuestos aromáticos son más estables que otros compuestos cíclicos debido al compartimiento de electrones deslocalizados por los enlaces π . Entre los hidrocarburos monoaromáticos se incluyen los conocidos colectivamente como BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y los tres xilenos), los cuales son clasificados como potencialmente peligrosos y son usados como indicadores de contaminación de suelos y aguas subterráneas ⁽²⁴⁾.

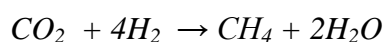
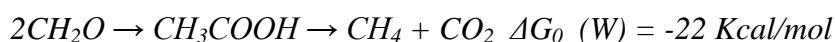
Figura 1.3 Pasos generalizados para la degradación de los BTEX ⁽⁴²⁾.



En condiciones aerobias los BTEX son degradados como donadores primarios de electrones. Los microorganismos son capaces de utilizarlos como fuente de energía y el aceptor final de electrones será el oxígeno por lo tanto disminuyen la concentración de oxígeno disuelto ⁽²⁴⁾.

En la biodegradación se desarrollan las siguientes reacciones para un compuesto orgánico que tendría diferentes condiciones redox y llevadas a cabo por los microorganismos. Se especifica la variación de la energía libre de Gibbs a un pH de 7 ⁽²⁴⁾.

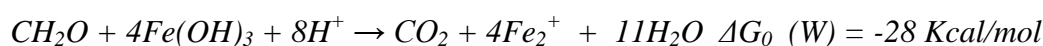
Metanogénicas, fermentativas



Reducción de sulfatos



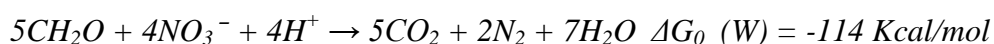
Reducción de hierro (III)



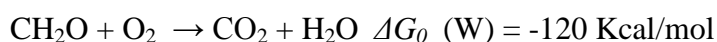
Reducción de manganeso (IV)



Desnitrificación



Respiración aerobia, reducción de oxígeno



1.2.3 MECANISMOS ABIOTICOS DE DEGRADACION DE CONTAMINANTES.

Los mecanismos abióticos son procesos como hidrólisis, oxidación-reducción, y/o eliminación, sin la intervención de microorganismos ⁽²⁴⁾, solo interactúan la energía solar, nutrientes presentes en el suelo, agua y aire.

1.3 FUENTES DE BTEX EN EL MEDIO AMBIENTE MARINO

Los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y los tres isómeros o-, m-, y p-xilenos), tienen similitud en algunas propiedades que los caracteriza por lo que se les menciona en conjunto; la presencia de estos en el agua es un riesgo para la salud y el medio ambiente, se conoce el alto porcentaje de BTEX en el petróleo y el uso masivo de productos derivados utilizados como energía, solventes y la producción de otros químicos. Estos contaminantes son introducidos al agua vía efluentes industriales y por contaminación atmosférica proveniente de emisiones vehiculares; sin embargo, el

origen más común de BTEX son los derrames de productos de petróleo, gasolina, diesel, lubricantes y de escapes de depósitos de combustible⁽³⁾.

1.4 METODOS PARA LA DETERMINACION DE BTEX ⁽³⁾.

Los procedimientos que pueden ser usados para la determinación de BTEX son: Cromatografía de Gases con detectores FID-PID usando técnicas de espacio de cabeza o de purga y atrapamiento (Método EPA 8021 modificado); Cromatografía de Gases con detector de masas, GC-MS (Método EPA 8260B); Extracción con metanol o Hexadecano seguida por purga y atrapamiento o inyección directa en GC o GC-MS y el método EPA 5035 que también es usado para la determinación de compuestos orgánicos. Sin embargo el más usado es el método 8260B que puede aplicarse a 121 analitos, la mayoría de los cuales se pueden aislar de la muestra empleando el procedimiento de purga y atrapamiento.

En este estudio utilizaremos *Microextracción en Fase Sólida* como técnica de introducción de los analitos a un *Cromatógrafo de Gases con Detector de Ionización de Llama*.

El procedimiento de análisis se puede resumir en dos pasos: extracción/desorción y el análisis por cromatografía de gases.

1. Extracción/desorción

En este paso los analitos son extraídos de la matriz y generalmente son preconcentrados antes de su desorción térmica en el inyector en el cromatógrafo de gases, para su separación en la columna. De esta forma los métodos por cromatografía de gases para la determinación de BTEX pueden ser clasificados de acuerdo a la naturaleza del agente extractante. La extracción puede ser por un gas, un líquido o un sólido. Los compuestos orgánicos con alta toxicidad son generalmente extraídos principalmente por un gas.

Este es el caso con los métodos más populares establecidos, extracción gas - líquido para compuestos volátiles en agua, tal como espacio de cabeza estático, purga y trampa⁽³⁾.

Cuando un sólido adsorbente es responsable de la extracción, la *Microextracción en Fase Sólida* es una buena elección para el análisis de BTEX en agua.

2. Análisis por cromatografía de gases.

Detectores, columnas y condiciones de gas cromatográfico para análisis de BTEX.

a) Detectores.

Los detectores que pueden usarse para el análisis de BTEX son: Detector de ionización de llama (FID), detector de fotoionización, y espectrómetro de masas (MSD). Las temperaturas en el rango de 260-300°C son recomendadas para ambos FID y PID. Las condiciones de flujo de gas (aire, nitrógeno y helio) son dependientes de la manufactura del equipo ⁽³⁾.

b) Columnas.

Para compuestos volátiles están diseñadas fases estacionarias no polares con 1.8-3 µm grosor de película y de 30-60 X 0.32-0.50 mm ID, estas son recomendadas para tener buena resolución de estos compuestos; el programa apropiado de temperatura y velocidad de flujo del gas de arrastre dependen de la selección de la columna ⁽³⁾.

1.4.1 INTRODUCCION A LA CROMATOGRAFIA.

Cromatografía de gases es un método físico de separación, identificación y determinación de componentes químicos en mezclas complejas que permite una alta resolución, buena sensibilidad, velocidad de análisis y buena exactitud.

Clasificación de la cromatografía por el tipo de fase móvil:

- = Cromatografía de gases (fase móvil gaseosa)
- = Cromatografía Líquida (fase móvil líquida)
- = Cromatografía de fluido supercrítico (Fase móvil fluido supercrítico)

En cromatografía de gases los analitos se distribuyen entre dos fases, una fase móvil y una fase estacionaria. En general la cromatografía de gases es un proceso para separar mezclas. Se inyecta una pequeña cantidad de muestra al cromatógrafo y el gas portador arrastra la muestra a través de la fase estacionaria. Los componentes se separan a medida que la muestra pasa por la misma. El área debajo de un pico de un cromatograma está relacionada con la cantidad de material presente y se puede cuantificar el analito.

Los picos se pueden identificar por su tiempo de retención que es el tiempo que tarda un compuesto en pasar por la columna.

$$K_c = \frac{\text{Concentración en la fase estacionaria}}{\text{Concentración en la fase móvil}} \quad \text{Ec. 1}$$

Los compuestos que tienen una K_c mayor de cero quedan retenidos en la columna.

El sistema de Cromatografía de Gases (CG) con Detector de Ionización de Llama (FID), está constituido de tres partes básicas: El inyector, la columna cromatográfica y el detector.

La columna está conectada al inyector del cromatógrafo de gases, zona por medio de la cual se introduce la mezcla de analitos. La columna, cuya temperatura está controlada por un horno, finaliza en la base del detector (FID) que produce una señal a la llegada de cada analito ⁽⁷⁾.

La respuesta del detector de ionización de llama a los hidrocarburos se basa en la detección de los iones que contienen carbono creados en el proceso de combustión de la llama que genera el detector, gracias a la combustión de una mezcla hidrógeno / aire ⁽⁷⁾.

El resultado de todos los métodos cromatográficos es una representación gráfica de los datos que se denomina cromatograma, que normalmente es una gráfica de tiempos de retención con respecto a la señal eléctrica que es generada por el detector y a través del análisis cuidadoso de una serie de cromatogramas podemos identificar el analito con estándares conocidos, sabiendo la cantidad de cada uno de los componentes en la mezcla original ⁽⁷⁾.

1.4.2 MICROEXTRACCION EN FASE SOLIDA (SPME).

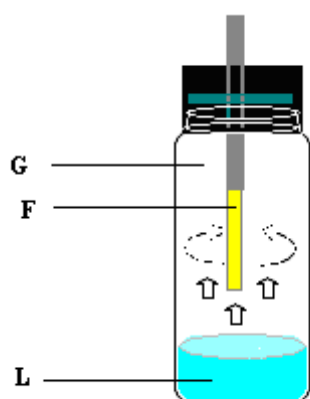
Los métodos tradicionales utilizados para la extracción de compuestos orgánicos volátiles implican mayor tiempo, requieren elevados volúmenes de muestra y disolvente; en el proceso puede haber contaminación de la muestra y pérdida de los analitos; por esta razón se ha utilizado la técnica de Microextracción en Fase Sólida (SPME) ya que resuelve algunos de los problemas mencionados como, tiempo de preparación y cantidad de la muestra, además es simple, rápida, con buena sensibilidad, de fácil automatización y mejora los límites de detección⁽⁸⁾.

La Microextracción en Fase Sólida, se desarrolló en 1990 por Pawlizyn y colaboradores en la que se utiliza fase estacionaria de acuerdo al tipo de analito⁽⁸⁾.

1.4.2.1 EQUILIBRIO DE DISTRIBUCIÓN ENTRE LAS FASES DEL SISTEMA.

Al encontrar los analitos en la muestra, se distribuyen en el sistema que consta de tres fases: Fase líquida(L), fase de la fibra (F) y fase gaseosa (G). Ver figura 1.1

Figura 1.4 Fibra en muestra líquida y equilibrio de fase⁽⁸⁾



$$K_1 = C_L / C_G$$

$$K_2 = C_F / C_L$$

$$K_3 = C_F / C_G$$

$$C_0 V_L = C_G V_G + C_L V_L + C_F V_F$$

Ec.2

Las constantes de equilibrio K_1 , K_2 , K_3 describen la proporción de concentraciones en las tres fases en el equilibrio y los analitos que inicialmente se encuentran en la muestra se distribuyen en las fases de acuerdo a la constante de distribución.

La concentración inicial de analito en la matriz es C_0 , V_L es el volumen de la fase líquida y C_G , C_L , C_F son las concentraciones del analito en el equilibrio en la fase

gaseosa, fase líquida y en la fibra y V_G , V_F son los volúmenes de la fase gaseosa y de la fibra ⁽⁸⁾.

1.4.2.2 TIPOS DE EXTRACCIÓN CON LA FIBRA DE SPME.

Se clasifica la extracción dependiendo de la forma de utilizar la fibra, cuando la fibra no entra en contacto con la matriz de la muestra Figura 1.2a se llama **SPME con espacio de cabeza** y en el caso que la fibra entra en contacto con la muestra Figura 1.2b **SPME directa** ⁽⁸⁾.

En la SPME con espacio de cabeza, la muestra se coloca en un vial, el cual está tapado con un séptum figura 1.2a, cuando la jeringa entra en el mismo dejando la fibra expuesta en el volumen gaseoso durante un tiempo establecido y se han adsorbido los analitos, se extrae la fibra y se coloca en el inyector del cromatógrafo figura 1.3a y una vez expuesta la fibra los analitos son desorbidos figura 1.3b, volatilizados y transportados a la columna cromatográfica⁽⁸⁾, de la misma forma se desarrolla la SPME directa figura 1.2b con la variante que a fibra se introduce directamente en la muestra.

Figura 1.5 En a) *SPME con espacio de cabeza* y en b) *SPME directa*.

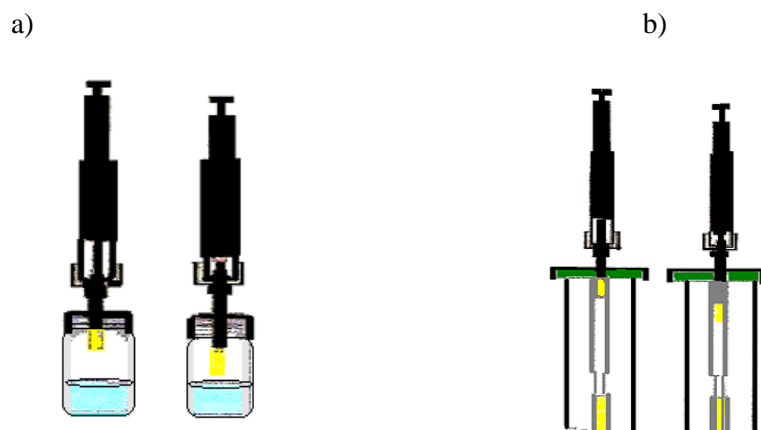
a)



b)



Figura 1.6 En a) Adsorción y en b) Desorción.



La desorción transcurre de acuerdo al punto de ebullición de los analitos y el tiempo de desorción depende de la temperatura del inyector y del flujo de gas portador que rodea la fibra ^(8,3)

1.4.3 INTERFERENCIAS DEL METODO

Adsorción de analitos en la fibra polimérica y desorción térmica de los mismos en el inyector del cromatógrafo de gases, son dos procesos importantes que se desarrollan en SPME-GC sin embargo el proceso de adsorción es el más importante, Cuando se realiza una adsorción adecuada tenemos una extracción exitosa ⁽³⁾.

1.4.3.1 FACTORES QUE AFECTAN LA ADSORCIÓN Y DESORCIÓN EN MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CON ESPACIO DE CABEZA HS-SPME

ADSORCION

En Microextracción con espacio de cabeza el equilibrio depende de dos constantes, la de equilibrio entre el líquido y la fase gaseosa, K_1 , que corresponde a la constante de Henry, la constante de equilibrio de la fase gaseosa y la fibra polimérica. La difusión ocurre en la fase gaseosa y es evidente que aumenta con el aumento de temperatura o agitación. Los parámetros de interés para SPME con espacio de cabeza son los que aumentan la concentración en la fase gaseosa y que

afectan la cantidad de analito extraído; la adición de sal, temperatura, y el volumen del espacio gaseoso del vial en que se coloca la muestra ⁽³⁾.

= Adición de Sal.

Incrementa el coeficiente de partición entre las fase acuosa y gaseosa, el total de BTEX adsorbidos es de acuerdo a la ecuación 2 ⁽³⁾

= Temperatura.

El factor de adsorción a temperaturas bajas es más importante que el incremento de concentración en la fase gaseosa por que la adsorción es un proceso exotérmico⁽³⁾. El aumento de temperatura hace que los analitos disueltos en la fase líquida pasen a la fase gaseosa y la adsorción no se lleva a cabo satisfactoriamente ya que los analitos no se adsorben a la fibra por que es un proceso que libera energía y se suma al calor aplicado a la muestra.

= Volumen del Espacio Gaseoso del Vial de la Muestra.

El total de analitos adsorbidos en Microextracción con Espacio de cabeza viene dado por la ecuación:

$$N = \frac{C_0 V_1 V_2 K_1 K_2}{K_1 K_2 V_1 + K_2 V_3 + V_2} \quad \text{Ec. 2}$$

El termino V_3 , es el volumen del espacio gaseoso del vial de la muestra y

$$K = K_1 K_2 \quad \text{Ec.3}$$

Y $V_1 \ll V_2$ entonces la ecuación queda de la siguiente manera⁽³⁾:

$$N = \frac{C_0 V_1 V_2 K}{K_2 V_3 + V_2} \quad \text{Ec. 4}$$

DESORCION

Después de haber extraído los analitos de la muestra, la fibra polimérica es colocada en el inyector de un cromatógrafo sin embargo este proceso se ve afectado por dos parámetros: *La temperatura y tiempo de desorción* , el analista se debe asegurarse que la desorción sea completa y que la fibra no este contaminada antes y después del análisis; para ello se debe acondicionar la fibra antes de iniciar los análisis y optimizar la temperatura del inyector y el tiempo de desorción de forma que los analitos sean desorbidos adecuadamente⁽³⁾.

1.5 VALIDACION DEL METODO

La validación es un procedimiento mediante el cual se puede establecer por medio de estudios de laboratorio que el método analítico cumple con el propósito para el cual fue creado. Los parámetros analíticos a validar para la determinación de BTX aparecen en los siguientes párrafos.

1.5.1 LINEALIDAD.

Este parámetro representa la capacidad del método de ofrecer proporcionalidad directa en un intervalo dado de la curva de calibración elaborada a partir de la concentración conocida de los patrones y la respuesta instrumental⁽¹¹⁾.

Al aplicar el método de mínimos cuadrados para construir una curva de calibración se consideran dos supuestos⁽¹¹⁾:

= Que existe una relación lineal entre la variable medida “y” y la concentración del analito “x”. Esto representa el modelo de regresión lineal dado por la ecuación:

$$y = bx + a$$

Ec. 6

Donde, a = intercepto en y; b = pendiente de la línea recta; y = respuesta instrumental; x = concentración.

= Las desviaciones de los puntos individuales respecto de la recta, es consecuencia del error en la medición.

Según el método de mínimos cuadrados la línea recta debe pasar por el centro de gravedad de los puntos $(\bar{x}, \bar{y})^{(12)}$. Para la aplicación del método y para fines prácticos se determinan tres cantidades: S_{xx} , S_{yy} y S_{xy} , las primeras dos son la suma de los cuadrados de las desviaciones de la media para los valores individuales x y y , la tercera es la suma de los productos de las desviaciones de la media para los valores individuales x y y ; se presentan en las ecuaciones siguientes ^(11, 12):

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N} \quad \text{Ec. 7}$$

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N} \quad \text{Ec. 8}$$

$$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N} \quad \text{Ec. 9}$$

x_i, y_i son pares individuales de datos, N es el número de pares de datos utilizados para construir la curva de calibración, \bar{x} , \bar{y} son los valores promedio de las variables, es decir:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N} \quad \text{y} \quad \bar{y} = \frac{\sum y_i}{N} \quad \text{Ec. 10}$$

De las expresiones S_{xx} , S_{yy} y S_{xy} se pueden determinar las siguientes ecuaciones:

La pendiente b de la línea recta:

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \quad \text{Ec. 11}$$

La ordenada en el origen o intercepto:

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad \text{Ec. 12}$$

La desviación estándar de la regresión:

$$S_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - b^2 S_{xx}}{N - 2}} \quad \text{Ec. 13}$$

El coeficiente de correlación:

$$r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} \cdot S_{yy}}} \quad \text{Ec. 14}$$

1.5.2 PRECISION.

La precisión de un método analítico, generalmente se expresa como la desviación estándar ó la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones, este parámetro puede ser conocido en tres niveles:

- = Repetibilidad: Expresa la precisión bajo las mismas condiciones operativas en un intervalo de tiempo corto.
- = Precisión intermedia: Expresa las variaciones intra - laboratorio esto indica diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.
- = Reproducibilidad: Expresa la precisión entre laboratorios⁽¹³⁾.

1.5.2.1 REPETIBILIDAD Y SENSIBILIDAD.

Es la concordancia que el método analítico ofrece entre los resultados obtenidos de pruebas individuales, cuando se hacen análisis sucesivos de una misma muestra tomada como referencia *bajo las mismas condiciones* (mismo laboratorio, equipamiento, operador, y en un intervalo corto de tiempo, en un mismo día o dentro de la misma semana).

1.5.2.2 REPRODUCIBILIDAD.

Es la concordancia que el método analítico ofrece en los resultados obtenidos de ensayos independientes, aplicando un mismo método, a una misma muestra en diferentes condiciones tales como diferentes laboratorios, distinto equipamiento, distintos operadores e intervalos de tiempo largos (varios días, semanas o meses).

1.5.3 EXACTITUD.

Se define como la proximidad entre el resultado obtenido y el valor aceptado, esta se debe establecer en todo el intervalo especificado para el método analítico⁽¹³⁾. La exactitud se calcula como el porcentaje de error relativo Ecuación 15. *Con un estándar certificado*, se compara el valor aceptado con el valor obtenido de la respuesta instrumental.

$$\% E_r = \frac{\text{concentración real} - \text{concentración calculada}}{\text{concentración real}} \times 100 \quad \text{Ec. 15}$$

Otra forma de calcular la exactitud *cuando no se cuenta con un estándar certificado* es buscando la concentración de analito en una muestra y luego se agrega una cantidad conocida de estándar aproximándose a la concentración de la muestra, se calcula la cantidad de analito agregada por la diferencia entre la concentración inicial y final de la muestra las cuales deben encontrarse en el rango de concentraciones de la curva de calibración.

$$\% \text{ recobro} = \frac{\text{concentración calculada}}{\text{concentración real}} \times 100 \quad \text{Ec. 16}$$

1.5.4 LIMITE DE DETECCION Y LIMITE DE CUANTIFICACION.

Límite de detección.

Es la concentración mas baja de analíto que puede detectarse con suficiente precisión a partir del blanco o señal de ruido, esta concentración no necesariamente se puede cuantificar.

Para métodos no instrumentales, el límite de detección generalmente se determina por medio del análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito y de esta manera establecer el mínimo nivel al cual el analito puede ser detectado en forma confiable, esta forma de encontrar el límite de detección, también puede ser empleada para métodos instrumentales.

Los instrumentos exhiben ruido de fondo y se emplea una aproximación que se basa en la comparación de señales obtenidas de blancos con muestras que contienen cantidades pequeñas de analito y determinando la señal ruido.

Una señal ruido de 3:1 o 2:1 se considera generalmente aceptable para estimar el límite de detección.

$$LD = x_{\text{blanco}} + 3 Sd \quad \text{Ec. 17}$$

Límite de cuantificación.

Es el límite inferior para mediciones cuantitativamente precisas ⁽¹²⁾.

La concentración del blanco se representa por (x_{blanco}) y Sd es la desviación estándar de la misma.

El límite de cuantificación se puede calcular de las siguientes formas:

a) **En una desviación estándar relativa del 10 %** se establece que el límite de cuantificación es:

b)

$$LC = x_{\text{blanco}} + 10 Sd \quad \text{Ec. 18}$$

c) **Para una desviación estándar relativa del 5 %** el límite de cuantificación se establece como:

d)

$$LC = x_{\text{blanco}} + 20 Sd \quad \text{Ec. 19}$$

En ambos casos, ya sea considerando una desviación relativa del 10 % o del 20 %, se debe *verificar la exactitud del método para el valor de LC encontrado.*

2.0 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 METODOLOGIA

Se optimizó algunos parámetros relacionados con la adsorción-desorción de los analitos en la fibra de SPME, así como el programa cromatográfico para la separación adecuada de los analitos en la fase estacionaria del cromatógrafo de gases; posteriormente se hizo el muestreo exploratorio en el límite del Golfo de Fonseca con nuestro país desarrollado en dieciocho estaciones que se detallan en la Figura 2.1. En el análisis de las muestras para la determinación de benceno, tolueno y xilenos se utilizó el método 8260B de la Agencia de Protección Ambiental Estadounidense EPA.

2.1.1 OPTIMIZACION DE PARAMETROS

La optimización de parámetros relacionados con la fibra y el programa de temperatura adecuado comprende dos etapas:

1- *Adsorción de analitos en la fibra SPME:* En el proceso de adsorción se debe maximizar la respuesta de los analitos para los siguientes parámetros: Volumen de muestra, temperatura y tiempo de agitación.

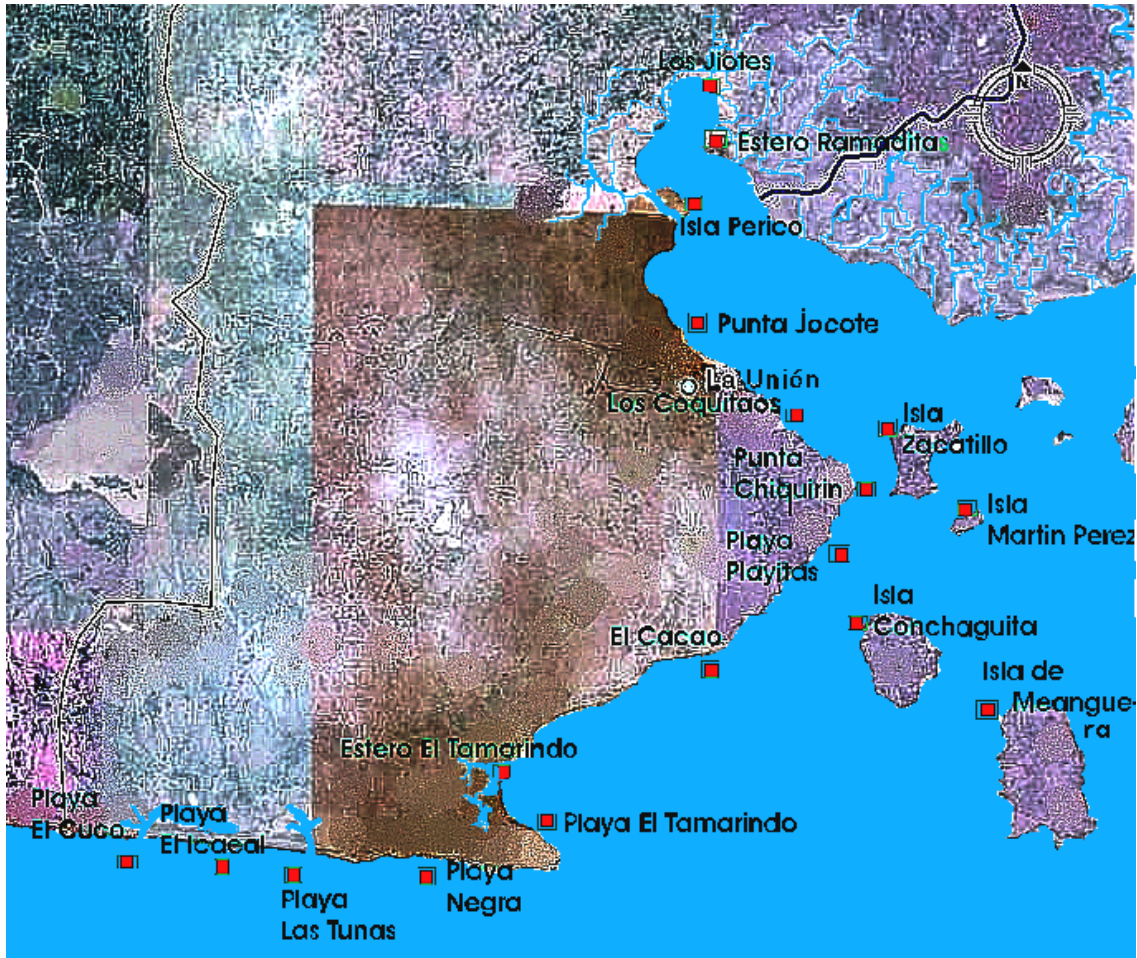
2- *Desorción de los analitos de la fibra SPME y separación de los analitos en la fase estacionaria:* La desorción térmica se desarrolla con la temperatura en el inyector y la separación de los analitos en la fase estacionaria por el programa de temperatura en el horno.

2.2 TOMA DE MUESTRAS

Los muestreos se han realizado en dieciocho estaciones ubicadas en la zona del Golfo de Fonseca que pertenece a nuestro país.

Figura 2.1 Puntos de muestreo en el área del Golfo de Fonseca.

(Las estaciones de muestreo están señaladas con puntos rojos).



Las muestras se colectaron a una profundidad de 30 cm en botellas de vidrio color ámbar, libre de contaminación por hidrocarburos ⁽¹⁵⁾.

Para mantener la integridad de las muestras se verificó que las botellas no tuvieran burbujas de aire y su almacenamiento frío (recomendable a 4°C), selladas y protegidas de la luz.

Los resultados del primero y segundo muestreo realizados en las fechas 1 de junio y 7 de julio respectivamente se presentan en la tabla 3.18.

Figura 2.2 Dispositivo para la toma de muestras.



El dispositivo permite sumergir el frasco hasta la profundidad deseada en el agua y sacar el mismo completamente lleno y cubierto de agua evitando burbujas de aire en el momento de tapar y sellar.

2.3 ANALISIS DE LAS MUESTRAS

Se coloca una cantidad de muestra sin ningun tratamiento previo, en un vial dejando un espacio gaseoso de 10 ml luego se expone la Fibra de Microextracción en Fase Sólida en el volumen gaseoso para la adsorción de los analitos; posteriormente se inyecta para que se de la desorción térmica en el inyector del Cromatógrafo de Gases; los analitos son arrastrados hacia la fase estacionaria de la columna donde se separan y pasan al Detector de Ionización de Llama el cual tiene como finalidad

producir una señal eléctrica proporcional a la concentración de analitos. Por medio de curvas de calibración de concentración versus la respuesta instrumental se obtiene la ecuación de la recta que se emplea para el cálculo de concentraciones de los analitos.

2.3.1 DESCRIPCION DEL METODO

El método utilizado para la determinación de BTX en aguas superficiales del Golfo de Fonseca es el 8260B de la Agencia de Protección Ambiental Estadounidense EPA “Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass spectrometry (GC/MS)”, se emplea para determinar compuestos volátiles en una variedad de desechos sólidos y es restringido para uso de cromatografía de gases con espectrómetro de masas complementado con un hábil experto en interpretación de espectros de masa, sin embargo se puede utilizar otro tipo de detector considerando la selección de estándares y sustitutos con propiedades similares a los analitos sin coeluir con ningún otro analito⁽⁹⁾.

Sin tener en cuenta el contenido de agua, el método se aplica a: Varias muestras de aire, suelo y agua superficial, residuos acuosos, licores cáusticos, licores acuosos, desechos de solventes, residuos aceitosos, ratones, alquitrán o brea, desperdicios fibrosos, emulsiones poliméricas, sedimentos, entre otros; y puede ser usado para cuantificar compuestos volátiles que tienen puntos de ebullición debajo de 200 °C⁽⁹⁾.

Para compuestos individuales el límite de cuantificación del método 8260B depende del instrumento y de la selección del método de preparación e introducción de la muestra además el límite de detección varía dependiendo de la sensibilidad del instrumento y los efectos producidos por la matriz, así por ejemplo para matrices muy complejas el límite de detección puede ser grande hasta de 500 - 1000. El porcentaje de recobro para varias matrices estudiadas es de 50% o más y en el caso de compuestos volátiles son más grandes en algunos casos del 100%⁽⁹⁾.

La técnica de introducción de los analitos al cromatógrafo es Microextracción en Fase Sólida (SPME), los analitos pasan a la fase estacionaria, interaccionan temporalmente y se separan de acuerdo al punto de ebullición y al programa de temperatura en el horno luego llegan al detector que en este caso es el de Ionización de Llama (FID).

2.3.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Utilizando agua marina del Estero El Tamarindo que no contenía BTX se preparó una solución patrón de 5mg/L de BTX y de esta se hace una serie de diluciones de concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/L de BTX, luego a cada uno se le hizo el procedimiento siguiente:

- = Agregar 15 ml de 0.1 mg/L en un vial y se expone la fibra en el espacio de gaseoso durante 5 minutos de agitación.
- = Guardar la fibra en el porta fibra, luego colocar en el inyector y exponerla para la desorción térmica de los analitos en el inyector del GC.

El mismo procedimiento se aplica a cada una de las diluciones 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/L por triplicado y a las muestras a temperatura ambiente.

2.3.3 EQUIPO DE LABORATORIO, REACTIVOS Y MATERIAL

Equipo:

Cromatógrafo de Gases Shimadzu modelo 14A

Analittical Gas Systems Parker Balston modelo TOC – 700NA

Columna PDMS 30m×0.32mm×1.33µm film.

Columna PDMS 10m×0.1mm×0.17µm film.

Fibra de Microextracción en Fase Sólida Supelco PDMS

Microjeringa de 10µL Hamilton, serie 2933087

Medidor de pH, VARIO SET, Serie 06052012

Medidor Multifunción, Yellow Springer Instruments, modelo 55

Agitador Magnético HANNA Instruments, modelo 200M

Materiales y reactivos

Hexano PA

Benceno PA

Tolueno PA

Xilenos PA

Hidrógeno PA

Helio PA

Aire PA

Desecante Drierite Stock # 23001
2 Balones volumétricos de 1000 ml
10 Balones volumétricos de 50 ml
2 probetas de 25 ml
5 viales para microextracción
Hot Plate con Stirrer y magneto
Papel parafilm
Una pipeta graduada de 5 ml.

2.4 CUANTIFICACION DE BTX EN MUESTRAS DE AGUA MARINA

Las curvas de calibración elaboradas a partir de soluciones de concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/L de benceno, tolueno y xilenos versus el área de los picos cromatográficos respectivos, permiten encontrar la concentración de cada muestra por medio de la extrapolación de la respuesta instrumental de las mismas, utilizando la ecuación de la línea recta encontrada en la elaboración de la curva de calibración de cada analito.

2.5 PROPIEDADES ANALITICAS DEL MÉTODO

El método se ha validado, estudiando los parámetros siguientes: Repetibilidad, linealidad, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud.

2.5.1 LINEALIDAD

Para su estudio se elaboraron tres curvas de calibración realizadas en una semana de trabajo, el procedimiento se describe en los siguientes párrafos:

- Los estándares se prepararon a partir de agua marina proveniente del Estero El Tamarindo ya que en ésta no se detectó BTX con el objetivo de tener la misma matriz de las muestras. Se hizo una solución patrón adicionando cierta cantidad de BTX para tener una concentración de 5 mg/L de la cual se hicieron diluciones obteniendo los estándares de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/L ,

- En un vial de 25 ml para cada concentración se agregan 15 ml de solución de BTX en el rango de concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/L respectivamente, dejando un espacio gaseoso de 10ml.
- Se coloca el porta fibra introduciendo la aguja en el vial, luego se expone la fibra en la parte gaseosa para que se de la adsorción de los analitos.
- Se aplica agitación durante 5 minutos utilizando un agitador magnético.
- Inmediatamente se guarda la fibra en el porta fibra, para llevarla al inyector del cromatógrafo de gases y se expone durante 5 minutos para la desorción térmica de los analitos.

La curva de calibración se construye graficando las concentraciones que ya conocemos versus el área respectiva de los picos cromatográficos.

2.5.2 REPETIBILIDAD

La elaboración de curvas de calibración en una misma semana (intervalos de tiempo cortos), aplicando el mismo método, mismas condiciones, mismo laboratorio, **mismo analista** permite hacer el análisis de varianza (ANOVA). Si los resultados indican que no hay diferencia significativa entre las curvas de calibración, por medio de la prueba F con un nivel de significancia del 5% el método es repetible en el intervalo de concentraciones que se ha trabajado ^(16, 17).

2.5.3 REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad del método se determina **variando el analista** en la elaboración de las curvas de calibración bajo las condiciones de linealidad, aplicando el mismo método pero diferentes condiciones tales como diferentes laboratorios, distinto equipamiento, distintos operadores e intervalos de tiempo largo. (Varios días, semana o meses).

Se desarrolló un análisis de varianza ANOVA se hace y posteriormente se aplica la prueba F con un nivel de significancia del 5%, y si no hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos de los dos analistas se establece que el método es reproducible en el intervalo de concentraciones de las curvas elaboradas ^(16, 17)

2.5.4 LIMITE DE DETECCION Y DE CUANTIFICACION

Se prepararon tres curvas de calibración de calibración para cada uno de los analitos, luego se siguió el procedimiento descrito en la sección 1.5.6 y se calculó el límite de detección de acuerdo a la ecuación 17; también se calculó el límite de cuantificación con la ecuación. 18.

2.5.5 EXACTITUD DEL METODO

Para estimar la exactitud del método se utilizó una muestra de agua del Estero El Tamarindo de la cual se tomó diez alícuotas, las cuales se analizaron para conocer la concentración inicial conociendo la concentración inicial de los compuestos en estudio de acuerdo al procedimiento 2.4 ; luego se agrega una cantidad de solución estándar de concentración conocida y se determinó la concentración final.

A la concentración final se restó la concentración inicial de BTX en la muestra y se calculó el porcentaje de recobro, ver la ecuación 16.

3.0 DISCUSION Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS

En esta sección se presentan los resultados de la determinación de BTX en muestras de aguas marinas superficiales y se exponen los resultados de la validación del método así como los parámetros: Oxígeno disuelto, pH y conductividad.

También se presentan los resultados de la optimización de parámetros importantes en la aplicación del método que se detallan en la sección 2.1.1

3.1 OPTIMIZACION DEL METODO DE EXTRACCION DE ANALITOS DE LA MUESTRA Y PARAMETROS DEL PROGRAMA CROMATOGRAFICO

La extracción de analitos de la muestra por medio de la técnica de Microextracción en Fase Sólida implica la optimización de tiempo y temperatura de agitación para la adsorción, así como la optimización de tiempo y temperatura en el inyector del cromatógrafo para la desorción los mismos en la fibra, además se debe designar el programa de temperatura adecuado en el horno.

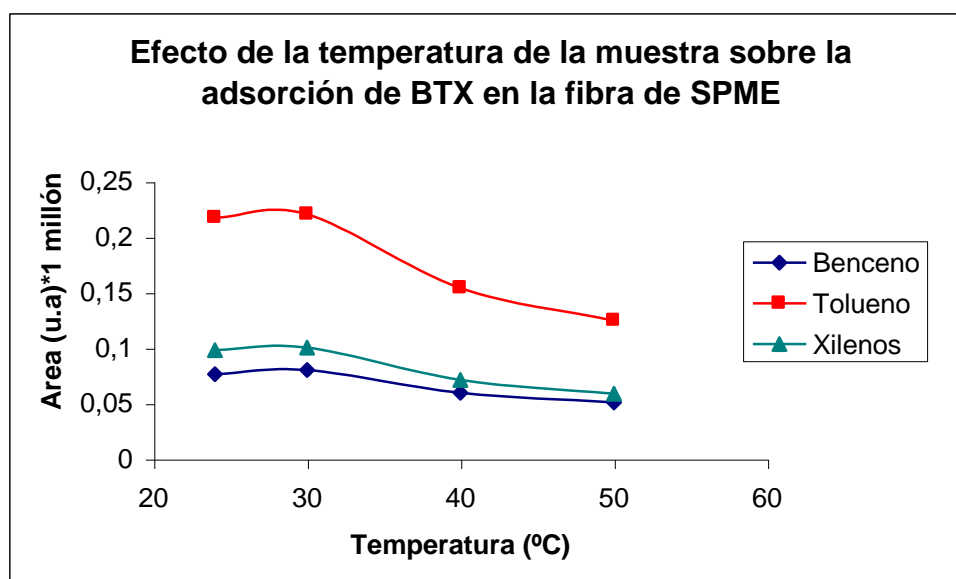
3.1.1 OPTIMIZACION DE TEMPERATURA Y TIEMPO DE ADSORCION DE BTX EN LA FIBRA DE MICROEXTRACCION EN FASE SOLIDA.

Para dar una apreciación de la temperatura óptima de adsorción de BTX, se realizaron pruebas colocando la muestra en baño de agua, variando su temperatura y manteniéndola constante en el momento de la adsorción de analitos. La prueba se hizo a las temperaturas de 24, 30, 40 y 50 °C, en la tabla 3.1 se presentan las áreas respectivas de estas temperaturas para cada analito.

TABLA 3.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA DE LA MUESTRA SOBRE LA ADSORCION DE LOS ANALITOS EN LA FIBRA.

Temperatura °C	Area (ua)		
	Benceno	Tolueno	Xilenos
24	76342	217430	97932
30	80163	220590	100261
40	59603	154032	71225
50	50965	124592	58536

Figura 3.1 Efecto de la temperatura de la muestra sobre la adsorción de BTX en la fibra de SPME.



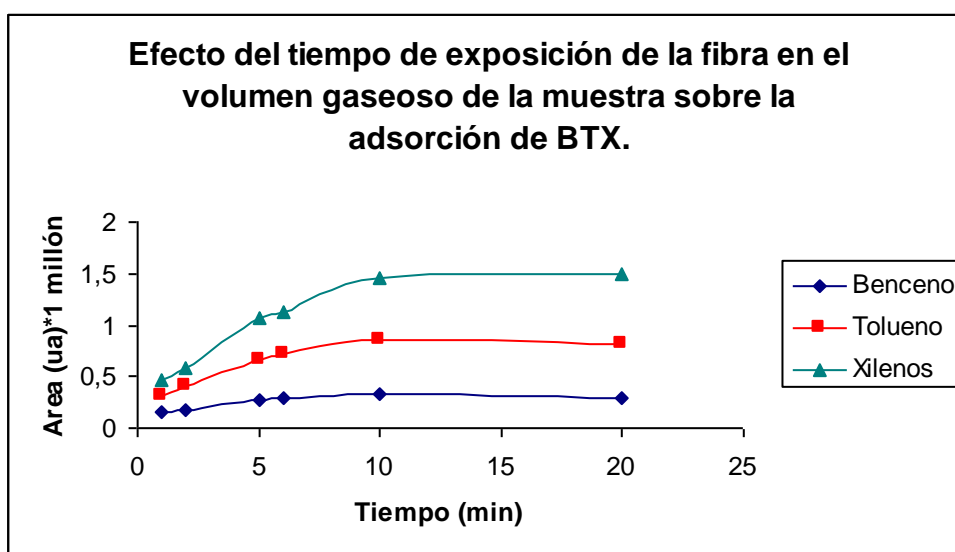
El gráfico presenta el efecto de la variación de temperatura en la muestra sobre la adsorción de analitos en la fibra; a mayor temperatura en la muestra hay menor adsorción de analitos en la fibra. Se utilizó temperatura ambiente en la adsorción de los analitos ya que en el rango de 25 a 30°C los analitos se adsorben muy bien.

En la evaluación del tiempo óptimo de exposición de la fibra en el volumen gaseoso del vial de la muestra se experimentó a diferentes tiempos colocándola a diferentes tiempos 1, 2, 5, 6, 10 y 20 minutos, en la tabla 3.2 se presenta un resumen de las áreas para cada analito.

TABLA 3.2 EFECTO DEL TIEMPO DE EXPOSICIÓN DE LA FIBRA EN EL VOLUMEN GASEOSO SOBRE LA ADSORCIÓN DE BTX EN LA FIBRA.

t (min)	Area (ua)		
	Benceno	Tolueno	Xilenos
1	146526	319726	457179
2	178999	401250	576337
5	265592	665694	1074347
6	289739	709370	1133096
10	324523	845312	1447323
20	287012	806643	1497235

Figura 3.2 Efecto del tiempo de exposición de la fibra en el volumen gaseoso del vial de la muestra sobre la adsorción de BTX en la fibra de SPME.



El tiempo óptimo para la adsorción es de seis a diez minutos, en la práctica se utilizó cinco minutos para no saturar la fibra de microextracción en fase sólida.

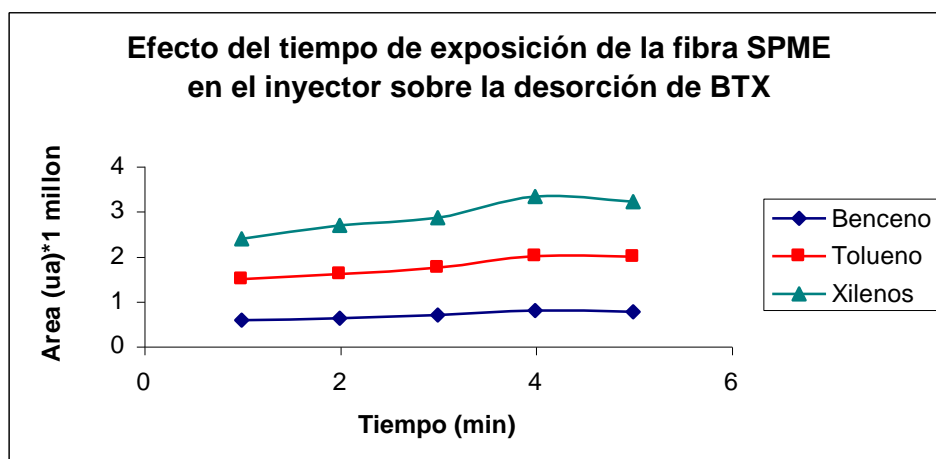
3.1.2 OPTIMIZACIÓN DE TIEMPO Y TEMPERATURA DE DESORCIÓN DE BTX DE LA FIBRA DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

El tiempo de desorción depende de la temperatura del inyector y del flujo del gas portador alrededor de la fibra, en este caso para todos los análisis se estableció un flujo constante de gas portador de 1ml/min., variando el tiempo desde 1, 2, 3, 4 y 5 minutos obteniendo áreas diferentes por la variación de tiempo, el resumen se muestra en la tabla 3.3

TABLA 3.3 EFECTO DEL TIEMPO DE EXPOSICIÓN DE LA FIBRA EN EL INYECTOR SOBRE LA DESORCIÓN DE BTX.

TIEMPO	Benceno	Tolueno	Xilenos
1	564839	1477769	2371673
2	609691	1595465	2679920
3	685278	1729665	2841724
4	789563	1991690	3315656
5	759988	1973072	3206636

Figura 3.3 Efecto del tiempo de exposición de fibra en el inyector sobre la desorción de BTX.

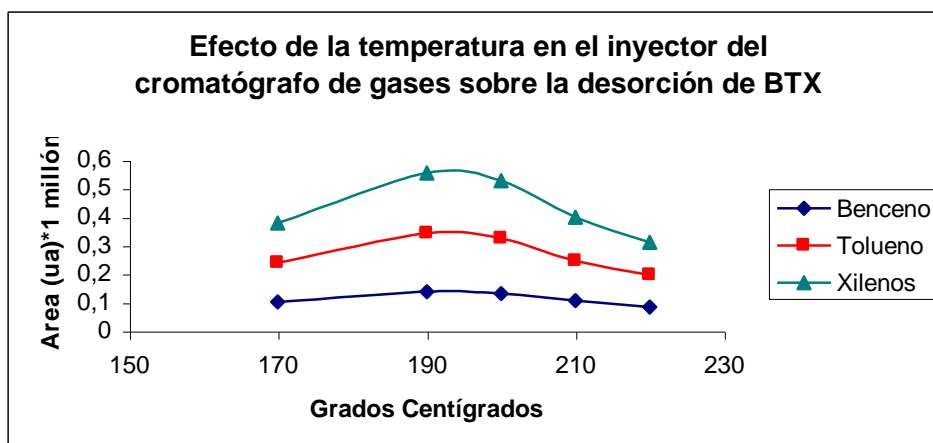


En la figura 3.3 las series 1, 2 y 3 representan benceno, tolueno y xilenos. Se determinó que el tiempo óptimo de la fibra en el inyector del cromatógrafo para la desorción térmica de los analitos es de cinco minutos.

TABLA 3.4 EFECTO DE LA TEMPERATURA DEL INYECTOR SOBRE LA DESORCION DE BTX.

TEMPERATURA	Benceno	Tolueno	Xilenos
170	102618	239278	378592
190	138289	342405	555744
200	131154	325147	527242
210	107053	246965	400302
220	83752	195834	311147

Figura 3.4 Efecto de la temperatura en el inyector del cromatógrafo de gases sobre la desorción de BTX.



En la figura 3.4, las series 1, 2 y 3 representan benceno, tolueno y Xilenos. La temperatura óptima de desorción esta en el rango de 190 a 200 °C, sin embargo en la practica se empleó la temperatura de 225 °C con el objetivo de eliminar completamente de la fibra de microextracción todo o casi todo lo de la matriz que se adsorbe a la misma.

3.1.3 OPTIMIZACION DE TEMPERATURAS EN EL PROGRAMA CROMATOGRÁFICO.

El control de temperatura en el horno permite variar la temperatura siguiendo un programa (rampa) de calentamiento y se emplea para separar de mejor forma los analitos en un tiempo razonable.

El programa de temperatura se estableció de la siguiente manera:

Columna:

Temperatura inicial: 50 °C, tiempo inicial: 1 min., rampa: 25 °C / min., temperatura final: 225, tiempo final: 1 min., temperatura del *detector e inyector*: 225 °C.

3.2 LINEALIDAD

Para determinar este parámetro se utilizó el método de adición estándar, graficando el área de pico contra la concentración de analitos; estos datos nos sirven para construir las curvas de calibración como se discutió en la sección 2.1.3.2, se preparó tres curvas de calibración en una semana de trabajo, con rango de concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/L de benceno, tolueno y xilenos. En la tabla 3.5, 3.6 y 3.7 se muestran las áreas y los promedios de áreas de benceno, tolueno y xilenos respectivamente.

TABLA 3.5 RESULTADOS DE CURVA DE CALIBRACION PARA LINEALIDAD (BENCENO)

Benceno				
C (mg/L)	Area 1	Area 2	Area 3	Area Promedio
Blanco	0	0	0	0
0.1	8792,33	11034,33	9734	9853,56
0.2	21523,33	26371,33	25739,67	24544,78
0.3	42898,33	39495,00	41773,67	41389,00
0.4	55100,33	57726,00	58762,67	57196,33
0.5	68355,33	73211,33	70317,67	70628,11
$a = -2637.1$ $b = 146289$ $Sr = 2098.00$ $r = 0.9976$				

TABLA 3.6 RESULTADOS DE CURVA DE CALIBRACION PARA LINEALIDAD (TOLUENO)

Tolueno				
C (mg/L)	Area 1	Area 2	Area 3	Area Promedio
Blanco	0	0	0	0
0.1	27727	33274	29115,67	30038,89
0.2	67607,33	81673,33	77536,00	75605,56
0.3	129142,33	121032,00	123411,67	124528,67
0.4	163960,67	173242,00	179446,00	172216,22
0.5	200675,00	215851,67	216328,67	210951,78
$a = -7077.5$ $b = 437204$ $Sr = 158821.98$ $r = 0.9979$				

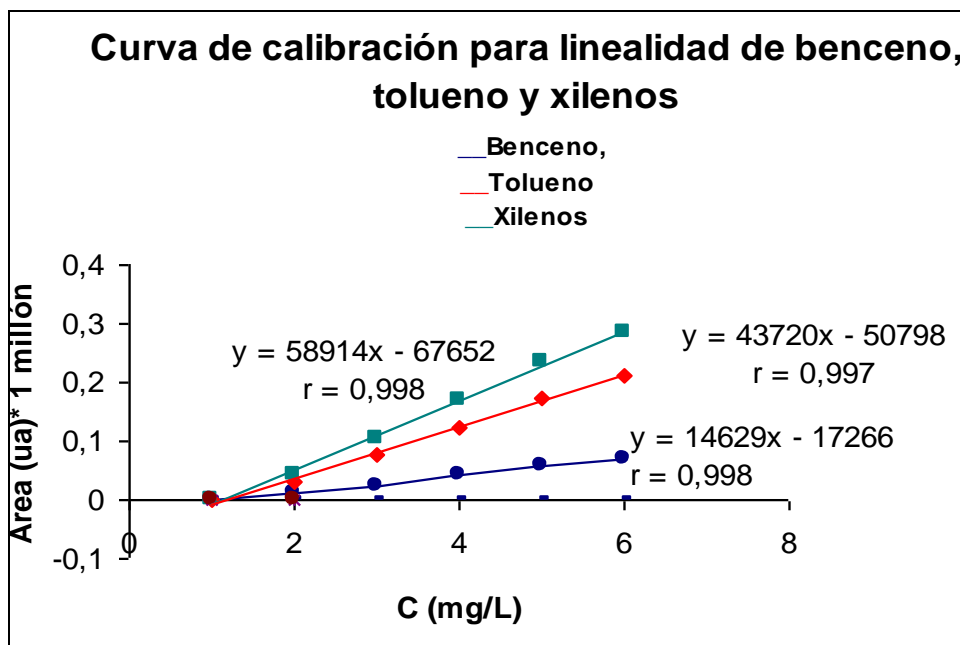
TABLA 3.7 RESULTADOS DE CURVA DE CALIBRACION PARA LINEALIDAD (XILENOS)

C (mg/L)	Xilenos			
	Area1	Area2	Area3	Area Promedio
Blanco	0	0	0	0
0.1	38061,67	45476	39314,33	40950,67
0.2	92128,67	114905	104922,00	103985,22
0.3	174729,00	167373,33	165433,33	169178,56
0.4	216958,00	235714,67	246603,33	233092,00
0.5	263490,33	288400	300328,00	284072,78
$a = -8737.8$ $b = 589137$ $Sr = 7584.7$ $r = 0.9980$				

Aplicando el método de mínimos cuadrados, los cálculos de la ecuación de la línea recta para cada uno de los analitos se realizaron de la siguiente forma:

Para calcular la pendiente (b), ecuación 11; la ecuación 12 para el intercepto (a); la ecuación 13 para calcular la desviación de la regresión (Sr) y el coeficiente de correlación (r) se calculó con la ecuación 14, cuyo resultado es 0.9976, 0.9979 y 0.9980 respectivamente para benceno, tolueno y xilenos. Esto indica que hay relación lineal entre la concentración de analitos (x) y el área de los picos cromatográficos resultantes (y) en el rango de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/L de BTX.

Figura 3.5 Curva de calibración para linealidad de Benceno, Tolueno y Xilenos.



3.3 REPETIBILIDAD DEL METODO

La elaboración de tres curvas de calibración en una misma semana bajo las condiciones de linealidad descritas en la sección 1.5.1 permite hacer los cálculos para ver si el método es repetible, ver sección 3.3.1.

En las siguientes tablas se presentan los datos de las curvas de calibración para hacer el análisis de varianza y establecer si hay diferencia significativa en las mediciones realizadas que corresponden a las curvas de calibración. Las curvas de calibración se prepararon a partir de un estándar de benceno, tolueno y xilenos de 5 mg/L respectivamente.

TABLA 3.8 RESULTADOS DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN (1), (2) Y (3) DE BENCENO.

BENCENO			
C (mg/L)	Areas (ua)		
	CURVA ₁	CURVA ₂	CURVA ₃
Blanco	0	0	0
0.1	8792,33	11034,33	9734
0.2	21523,33	26371,33	25739,67
0.3	42898,33	39495,00	41773,67
0.4	55100,33	57726,00	58762,67
0.5	68355,33	73211,33	70317,67
	<i>b = 143450,1905</i>	<i>b = 148358.667</i>	<i>b = 147059,524</i>
	<i>a = -3084,2698</i>	<i>a = -2450.0000</i>	<i>a = -2376,9365</i>
	<i>Sr = 3228,3451</i>	<i>Sr = 2121.8316</i>	<i>Sr = 2242,9447</i>
	<i>r = 0,994</i>	<i>r = 0,9977</i>	<i>r = 0,997</i>

Figura 3.6 Curva de calibración de benceno (día 1)

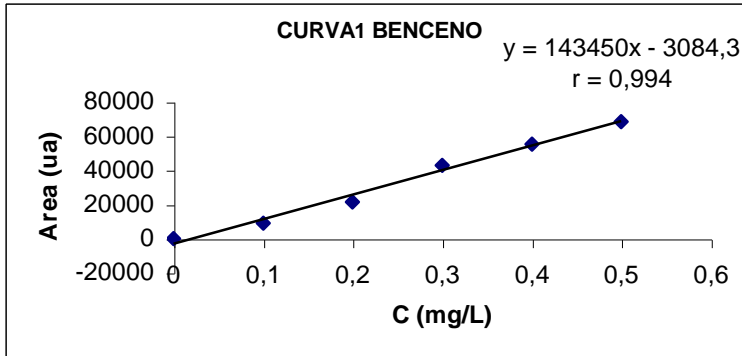


Figura 3.7 Curva de calibración de benceno (día 2)

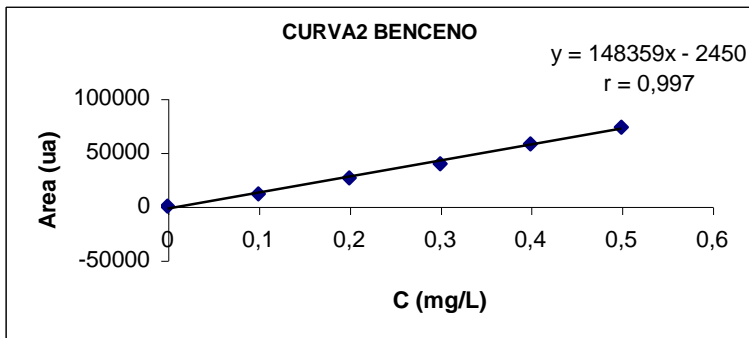


Figura 3.8 Curva de calibración de benceno (día 3)

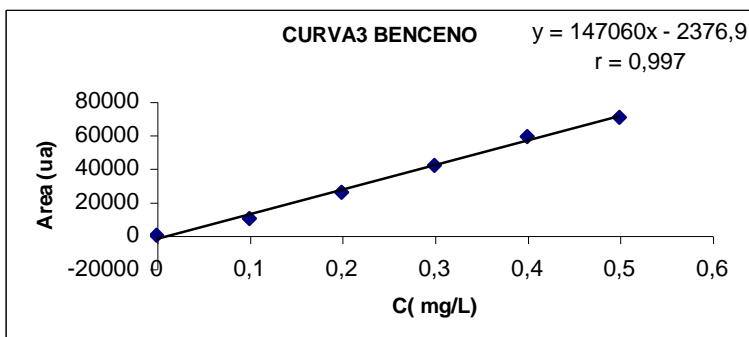


TABLA 3.9 RESULTADOS DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN (1), (2) Y (3) DE TOLUENO.

TOLUENO			
C (mg/L)	Areas (ua)		
	CURVA ₁	CURVA ₂	CURVA ₃
Blanco	0	0	0
0.1	27727	33274	29115,67
0.2	67607,33	81673,33	77536,00
0.3	129142,33	121032,00	123411,67
0.4	163960,67	173242,00	179446,00
0.5	200675,00	215851,67	216328,67
	$b = 421031,714$	$b = 439577,429$	$b = 451002,858$
	$a = -7072,5397$	$a = -5715,5239$	$-a = 8444,38097$
	$Sr = 8757,3443$	$Sr = 4920,3381$	$Sr = 7322,2043$
	$r = 0,995$	$r = 0,999$	$r = 0,997$

Figura 3.9 Curva de calibración de tolueno (día 1)

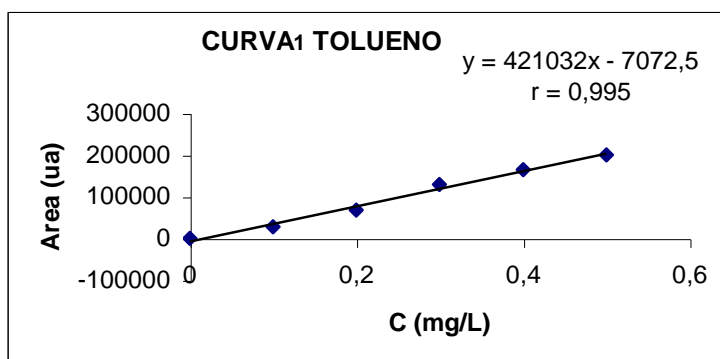


Figura 3.10 Curva de calibración de tolueno (día 2)

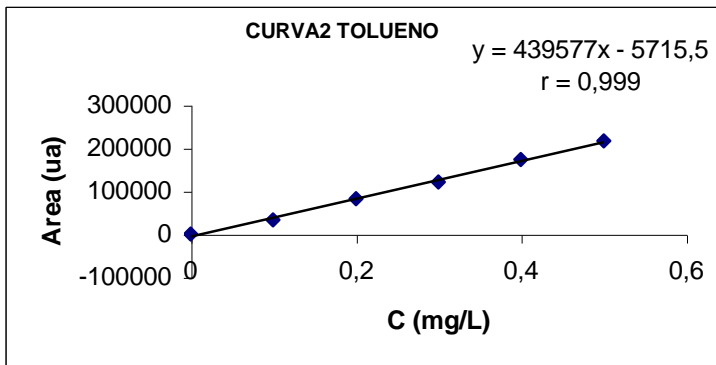


Figura 3.11 Curva de calibración de tolueno (día 3)

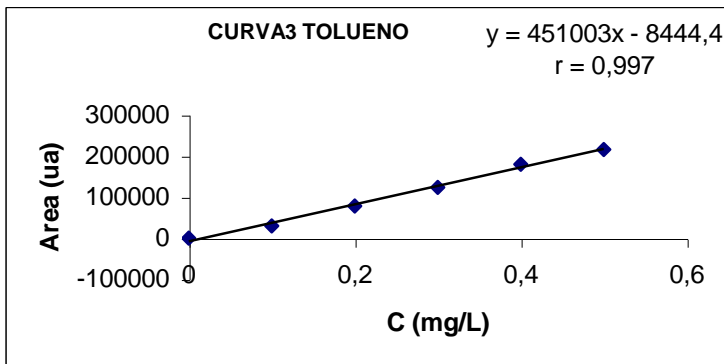


TABLA 3.10 RESULTADOS DE LAS CURVAS DE CALIBRACION (1), (2) Y (3) DE XILENOS.

XILENOS			
C (mg/L)	Areas (ua)		
	CURVA ₁	CURVA ₂	CURVA ₃
Blanco	0	0	0
0.1	38061,67	45476,00	39314,33
0.2	92128,67	114905,00	104922,00
0.3	174729,00	167373,33	165433,33
0.4	216958,00	235714,67	246603,33
0.5	263490,33	288400,00	300328,00
	$b = 553355$	$b = 590052.667$	$b = 624005.238$
	$a = -7444.03$	$a = -5535.000$	$a = -13234.4762$
	$Sr = 12030.3$	$Sr = 6038.3646$	$Sr = 11139.8615$
	$r = 0.995$	$r = 0.999$	$r = 0.996$

Figura 3.12 Curva de calibración de xilenos (día 1)

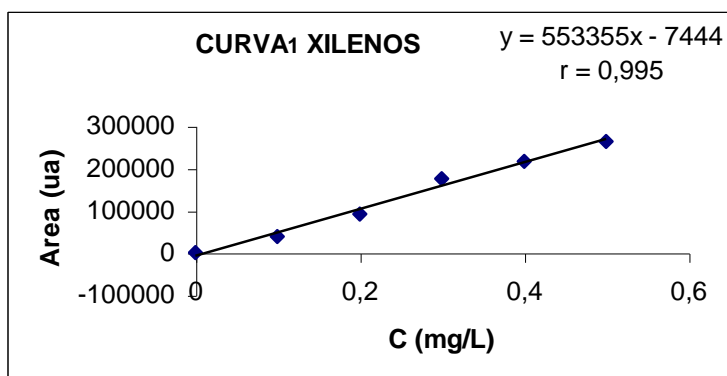


Figura 3.13 Curva de calibración de xilenos (día 2)

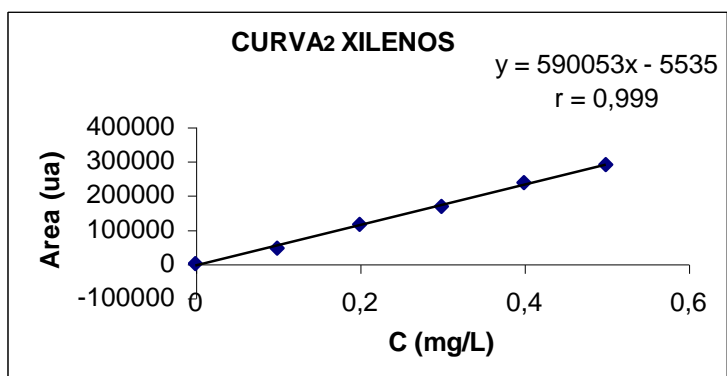
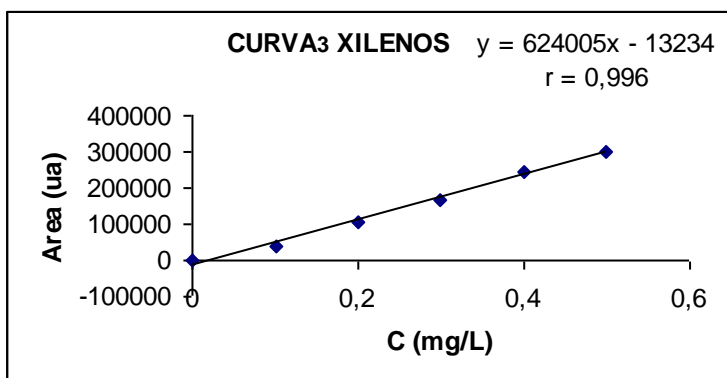


Figura 3.14 Curva de calibración de xilenos (día 3)



3.3.1 ANALISIS DE VARIANZA ANOVA.

La aplicación del análisis de varianza (ANOVA) determina si el método es repetible ya que se puede establecer si existen o no diferencias significativas entre las curvas de calibración hechas por el mismo analista en diferentes días. El contraste F indica que si no hay diferencia significativa con un nivel del 5%, se puede establecer que el método es repetible en el intervalo de concentración dado^(17,18).

El contraste supone que las poblaciones de donde se extraen las muestras son normales y el estadístico F está dado por:

$$F_{Exp} = \frac{(S_{r1})^2}{(S_{r2})^2}$$

Donde S_{r1} y S_{r2} corresponden a las desviaciones de la regresión de las dos curvas de calibración que se comparan, de tal forma que el numerador $(S_{r1})^2$ sea mayor que el denominador $(S_{r2})^2$.

Las desviaciones de la regresión de las dos curvas de calibración que se están comparando viene dada por S_{r1} y S_{r2} , donde el numerador $(S_{r1})^2$ tiene que ser mayor que el denominador $(S_{r2})^2$ de modo que F sea siempre ≥ 1 , luego se compara el F experimental con el F de tablas^(17, 18).

El numero de grados de libertad se considera como n_1-1 y $n_2 - 2$, del numerador y denominador respectivamente⁽¹⁸⁾.

Con la prueba F se establece una hipótesis nula que puede ser aceptada o rechazada dependiendo del resultado, es decir hay que probar si es significativa entre dos varianzas muestrales, $H_0 = \sigma_1^2 = \sigma_2^2$ ⁽¹⁸⁾.

TABLA 3.11 ANALISIS DE VARIANZA DE LAS CURVAS DE CALIBRACION (1), (2) Y (3) DE BENCENO.

BENCENO					
Curva	Desviación (S_r)	Datos (n)	F_{Exp}	F_{Tab}	Conclusión
1	3228.3451	6	$\frac{(S_{r1})^2}{(S_{r2})^2} = 2.31$	$F_{5,5,5\%} = 5.05$	$F_{Exp} < F_{Tab}$
2	2121.8316	6			
2	2121.8316	6	$\frac{(S_{r3})^2}{(S_{r2})^2} = 1.12$	$F_{5,5,5\%} = 5.05$	$F_{Exp} < F_{Tab}$
3	2242.9447	6			
1	3228.3451	6	$\frac{(S_{r1})^2}{(S_{r3})^2} = 2.07$	$F_{5,5,5\%} = 5.05$	$F_{Exp} < F_{Tab}$
3	2242.9447	6			

Los resultados de F que se presentan en la tabla 3.11 indican que no hay diferencia estadística significativa entre las tres curvas de benceno.

TABLA 3.12 ANALISIS DE VARIANZA DE LAS CURVAS DE CALIBRACION (1), (2) Y (3) DE TOLUENO.

TOLUENO					
Curva	Desviación (S_r)	Datos (n)	F_{Exp}	F_{Tab}	Conclusión
1	8757,34433	6	$\frac{(S_{r1})^2}{(S_{r2})^2} = 3.17$	$F_{5,5,5\%} = 5.05$	$F_{Exp} < F_{Tab}$
2	4920,33811	6			
2	4920,33811	6	$\frac{(S_{r3})^2}{(S_{r2})^2} = 2.21$	$F_{5,5,5\%} = 5.05$	$F_{Exp} < F_{Tab}$
3	7322,2043	6			
1	8757,34433	6	$\frac{(S_{r1})^2}{(S_{r3})^2} = 1.43$	$F_{5,5,5\%} = 5.05$	$F_{Exp} < F_{Tab}$
3	7322,2043	6			

En la tabla 3.12 por los valores obtenidos de F, se puede ver que no hay discrepancia estadística notable entre las tres curvas de tolueno

TABLA 3.13 ANALISIS DE VARIANZA DE LAS CURVAS DE CALIBRACION (1), (2) Y (3) DE XILENOS.

XILENOS					
Curva	Desviación (S_r)	Datos (n)	F_{Exp}	F_{Tab}	Conclusión
1	12030,3268	6	$\frac{(S_{r1})^2}{(S_{r2})^2} = 3.97$	$F_{5,5,5\%} = 5.05$	$F_{Exp} < F_{Tab}$
2	6038,36459	6			
2	6038,36459	6	$\frac{(S_{r3})^2}{(S_{r2})^2} = 3.40$	$F_{5,5,5\%} = 5.05$	$F_{Exp} < F_{Tab}$
3	11139,8615	6			
1	12030,3268	6	$\frac{(S_{r1})^2}{(S_{r3})^2} = 1.17$	$F_{5,5,5\%} = 5.05$	$F_{Exp} < F_{Tab}$
3	11139,8615	6			

La diferencia que resulta al comparar las tres curvas de xilenos entre sí no es estadísticamente significativa y se puede ver en la tabla 3.13.

Finalmente, con los resultados de las tablas 3.11, 3.12 y 3.13, es notable que los F experimentales son menores que los F de tablas en todos los casos; por lo tanto se establece que el método es repetible para benceno, tolueno y xilenos.

3.4 LIMITE DE DETECCION Y LIMITE DE CUANTIFICACION

El límite de detección es la concentración más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra bajo las condiciones experimentales establecidas.

En la tabla 3.14 se presentan las ecuaciones obtenidas de las curvas realizadas en las fechas 12, 13 y 14 de julio de 2007, a partir de las cuales se calculan los límites de detección y cuantificación.

TABLA 3.14 CALCULOS DEL LIMITE DE DETECCION Y LIMITE DE CUANTIFICACION.

BENCENO	
Límite de detección y límite de cuantificación	
Ecuación de la recta	Concentración de blanco
$y = 143450x - 3084,3$	$Xb_1 = 0,02$
$y = 148359x - 2450$	$Xb_2 = 0,02$
LD = 0.03 mg/L	$X_{prom} = 0.02$
LC = 0.05 mg/L	Sd = 0.003
TOLUENO	
Límite de detección y límite de cuantificación	
Ecuación de la recta	Concentración de blanco
$y = 421032x - 7072,5$	$Xb_1 = 0,02$
$y = 439577x - 5715,5$	$Xb_2 = 0,01$
LD = 0.02 mg/L	$X_{prom} = 0.02$
LC = 0.05 mg/L	Sd = 0.003
XILENOS	
Límite de detección y límite de cuantificación	
Ecuación de la recta	Concentración de blanco
$y = 553355x - 7444$	$Xb_1 = 0,01$
$y = 590053x - 5535$	$Xb_2 = 0,01$
LD = 0.03 mg/L	$X_{prom} = 0.01$
LC = 0.07 mg/L	Sd = 0.006

3.5 EXACTITUD

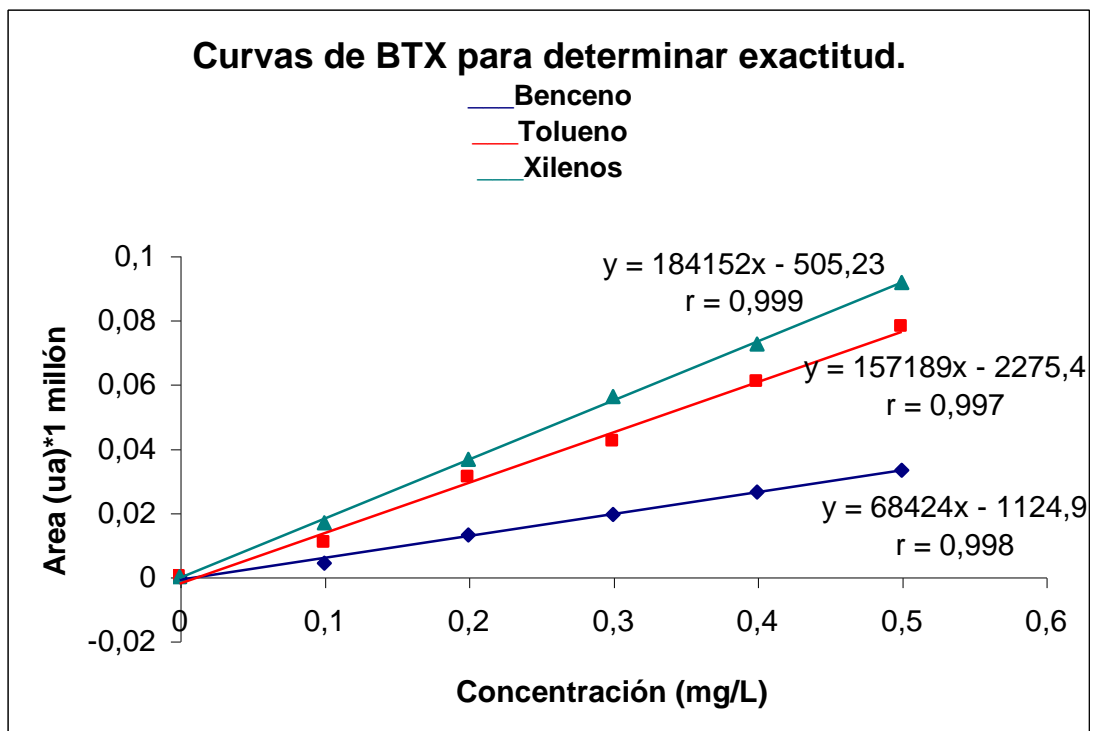
En la determinación de la exactitud se utilizó una muestra de agua del Estero El Tamarindo de la cual se determinó la concentración inicial de BTX, luego se tomó 10 réplicas de la misma y se adicionó una cantidad de solución BTX de concentración de 5mg/L; para realizar los cálculos se hizo una curva de calibración con un rango de 0.1 a 0.5 mg/L de BTX, ver Figura 3.11, obteniendo los siguientes resultados de pendiente (b), intercepto (a) y coeficiente de correlación (r):

Benceno: $b = 68424$; $a = 22754$; $r = 0.998$; Tolueno: $b = 157189$; $a = 2275$; $r = 0.997$; Xilenos: $b = 184152$; $a = 505.23$; $r = 0.999$.

TABLA 3.15 DATOS DE CURVA DE CALIBRACION PARA LA DETERMINACION DE EXACTITUD.

C (mg/L)	BENCENO Area (ua)	TOLUENO Area (ua)	XILENOS Area (ua)
Blanco	0	0	0
0,1	4079	10602	16698
0,2	12847	30957	36432
0,3	19356	42148	56103
0,4	26405	60671	72434
0,5	33199	77753	91531

Figura 3.15 Curvas de calibración de BTX para determinar exactitud



3.16 RESULTADOS DE CONCENTRACIONES FINALES DE BTX Y PORCENTAJES DE RECOBRO PARA CADA ANALITO.

No	Benceno		Tolueno		Xilenos	
	C final	% de recobro	C final	% de recobro	C final	% de recobro
1	0,34	112,31	0,32	106,60	0,30	99,25
2	0,37	121,70	0,34	113,85	0,33	111,15
3	0,36	120,76	0,37	122,23	0,35	118,33
4	0,36	118,43	0,35	117,04	0,34	112,90
5	0,34	112,93	0,34	113,89	0,33	109,55
6	0,31	102,51	0,30	100,87	0,29	95,24
7	0,33	108,77	0,32	108,03	0,31	103,67
8	0,33	110,29	0,33	108,48	0,31	103,35
9	0,35	115,45	0,34	112,64	0,32	106,99
10	0,31	102,14	0,31	102,64	0,30	99,84
		Promedio= 112.53		Promedio= 110.63		Promedio = 106.03

El porcentaje de recobro se calculó de acuerdo a la ecuación 16; los resultados indican que el método utilizado tiene una buena exactitud por que los resultados del recobro promedio son cercanos al valor aceptado: Benceno 112.53 %; tolueno 110.63% y xilenos 106.03%; esto indica que en el intervalo de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/L se establece una buena exactitud.

3.6 CUANTIFICACION DE BTX EN MUESTRAS DE AGUA MARINA

El muestreo se realizó en 18 estaciones ubicadas en el Golfo de Fonseca; las muestras se preservaron en botellas color ámbar de 500 ml en hielera y luego en refrigeración a 4 °C para mantener su integridad; después del muestreo se hizo el análisis en el transcurso de una semana. La cuantificación de los BTX se hizo de acuerdo a la sección 2.3. También se determinó a cada muestra los parámetros: Salinidad, conductividad, pH, oxígeno disuelto y temperatura. El oxígeno disuelto,

salinidad, temperatura y pH fueron analizados in situ; todas estas medidas se realizaron para observar el comportamiento de los mismos.

La salinidad se puede expresar como el número de gramos de sal por kilogramo de muestra o partes por mil ‰. La medida de salinidad indica que la muestra tiene una mezcla estándar de sal y de agua de mar. Los métodos estándar la definen como sólidos totales en el agua cuando todos los carbonatos han sido convertidos en óxidos, todos los bromuros y yoduros han sido reemplazados por una cantidad equivalente de cloruros y toda la materia orgánica ha sido oxidada. Numéricamente es menor que los sólidos disueltos, o residuo filtrable.

El oxígeno disuelto oxida la materia orgánica e inorgánica hacia productos finales

inocuos, es esencial para mantener los organismos aerobios en condiciones favorables para el crecimiento y reproducción normal, de las poblaciones de peces y otros organismos acuáticos. Uno de los parámetros que determinan las condiciones adecuadas para sustentar la vida acuática es el oxígeno disuelto y la norma técnica de calidad ambiental establece que un cuerpo superficial debe tener por lo menos 5.0mg/L de oxígeno⁽²²⁾.

La solubilidad del oxígeno disuelto decrece con el aumento de temperatura y por efecto de la salinidad o presencia de cloruros.

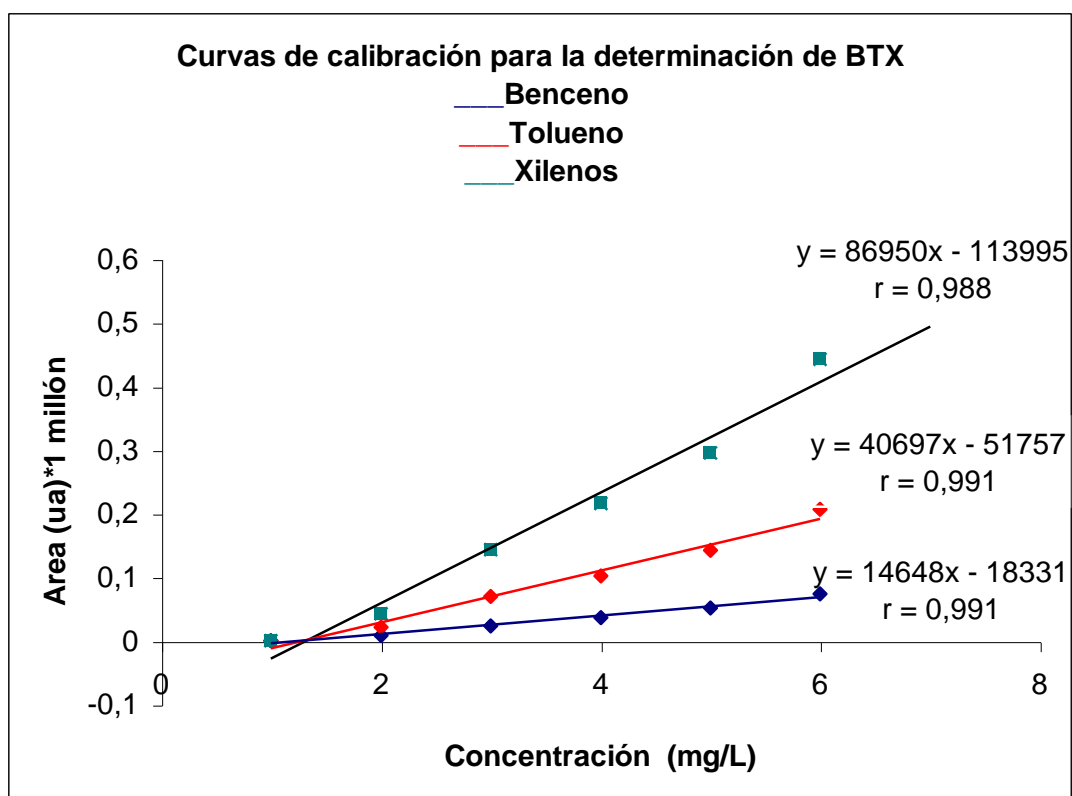
TABLA 3.17 RESULTADOS DE PH, CONDUCTIVIDAD, TEMPERATURA, SALINIDAD Y OXIGENO DISUELTO.

Lugar	pH	Conductividad (mS/cm)	Temperatura (°C)	Salinidad
1- Playa El Cuco	8.14	24.7	32.1	34
2- Playa El Icacal	8.13	24.6	32.2	33
3- Playa Las Tunas	8.0	23.8	33.6	35
4- Playa Negra	8.12	24.2	33.8	34
5- Isla de Meanguera	8.12	24.1	30.1	35.5
6- Isla de Conchaguita	8.05	23.6	29.9	35.5
7- Playa Playitas	8.07	23.8	29.9	35
8- Isla Martín Perez	8.20	23.9	29.7	35
9- Isla Zacatillo	8.10	24.0	29.3	35
10- Punta Jocote	7.94	22.9	31.5	33
11- Isla Perico	7.91	23.2	32.1	35
12- Los Jiotes	7.92	22.8	31.4	36
13- Estero Ramaditas	7.81	22.4	31.3	35
14- Punta Chiquirin	8.13	23.9	28.8	36
15- El Cacao	8.08	23.6	30.1	35
16- Playa El Tamarindo	8.05	23.2	32	34
17- Entrada a Estero El tamarindo	7.93	22.0	32	34
18- Entre Naval y Puerto Cutuco.	7.90	23.5	30.5	36

3.6.1 PRIMER MUESTREO

Después de elaborar la curva de calibración ver figura 3.16 y realizar los análisis en el cromatógrafo de gases se determinó las concentraciones de analito correspondiente al primer muestreo por medio de la ecuación de la recta.

Figura 3.16 Curva de calibración para determinación de las concentraciones de Benceno, Tolueno y Xilenos. (Primer muestreo)



3.6.2 SEGUNDO MUESTREO

En la figura 3.17 se presenta la curva de calibración por medio de la cual se desarrollaron los análisis del segundo muestreo y se determinó las concentraciones de analito utilizando la ecuación de la recta.

Figura 3.17 Curva de calibración para determinar las concentraciones de Benceno, Tolueno y Xilenos. (Segundo muestreo).

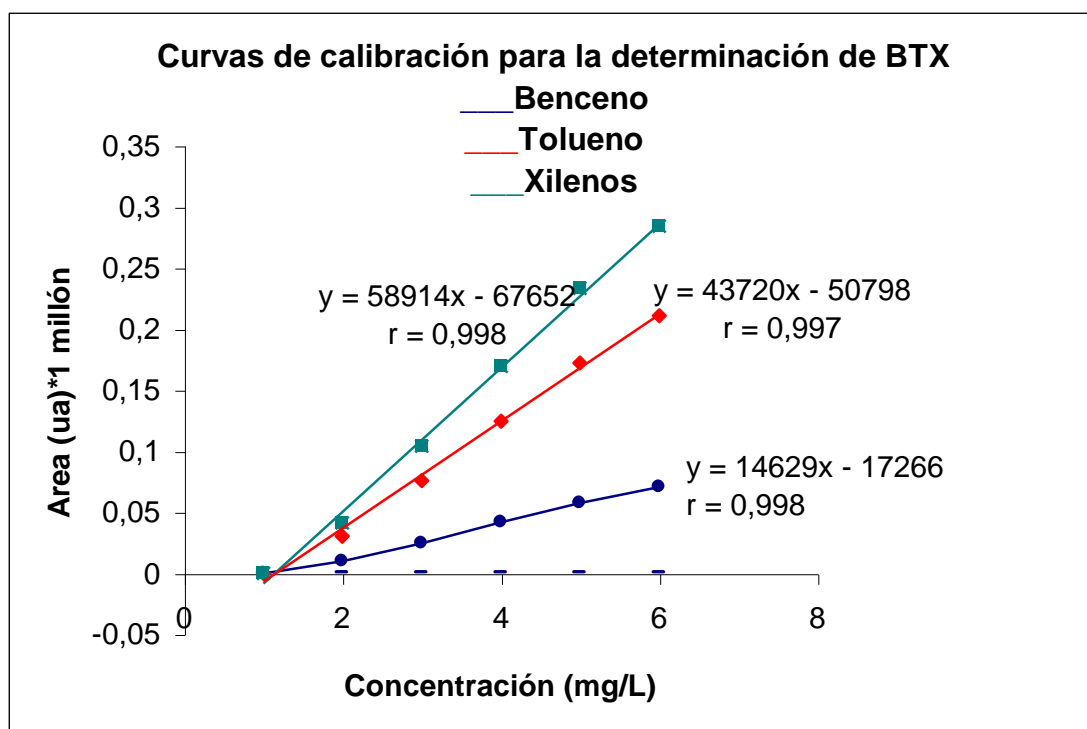


TABLA 3.18 RESULTADOS DE CONCENTRACIONES DE BENCENO, TOLUENO Y XILENOS (PRIMER Y SEGUNDO MUESTREO).

Lugar de muestreo	Benceno		Tolueno		Xilenos	
	mg/L	% RSD	mg/L	% RSD	mg/L	% RSD
1- Playa El Cuco	0,03	9,04	0,02	23,89	0,02	35,84
2- Playa El Icacal	0,03	10,28	0,02	28,64	0,02	48,17
3- Playa Las Tunas	0,03	20,40	0,02	28,29	0,03	30,04
4- Playa Negra	0,01	99,86	0,02	25,76	0,03	36,03
5- Isla de Meanguera	0,04	39,58	0,04	56,59	0,04	65,86
6- Isla de Conchaguita	0,04	32,95	0,04	56,05	0,04	64,85
7- Playa Playitas	0,04	44,52	0,04	56,98	0,04	57,75
8- Isla Martín Pérez	0,04	32,81	0,04	51,66	0,04	58,29
9- Isla Zacatillo	0,04	54,42	0,04	58,25	0,04	65,03
10- Punta Jocote	0,04	39,54	0,03	62,97	0,04	64,72
11- Isla Perico	0,05	39,46	0,04	49,37	0,04	58,68
12- Los Jotes	0,04	35,70	0,04	52,21	0,04	56,67
13- Estero Ramaditas	0,04	41,84	0,04	57,25	0,04	65,92
14- Punta Chiquirín	0,02	10,41	0,02	4,39	0,02	3,16
15- El Cacao	0,03	7,90	ND	ND	ND	ND
16- Playa El Tamarindo	0,03	2,95	0,02	3,71	0,02	1,32
17- Entrada a Estero El Tamarindo	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18- Entre Naval y Puerto Cutuco	0,03	3,60	0,02	1,16	0,02	0,51

La Tabla 3.18 presenta el promedio concentraciones de benceno, tolueno y xilenos del primero y segundo muestreo, además se presenta el porcentaje de desviación estándar relativa de los resultados obtenidos para cada analíto.

Figura 3.18 Cromatograma del punto de muestreo ubicado en el estero ramaditas.

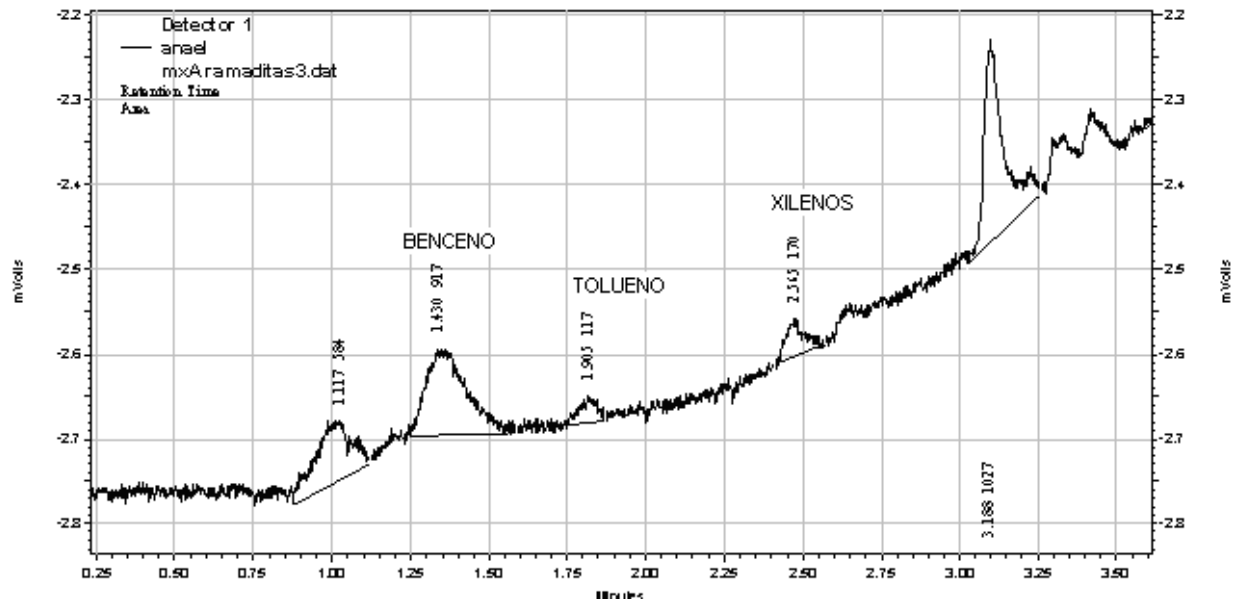


Figura 3.19 Cromatograma del punto de muestreo ubicado en las cercanías del estero Chapernal (Los jotes).

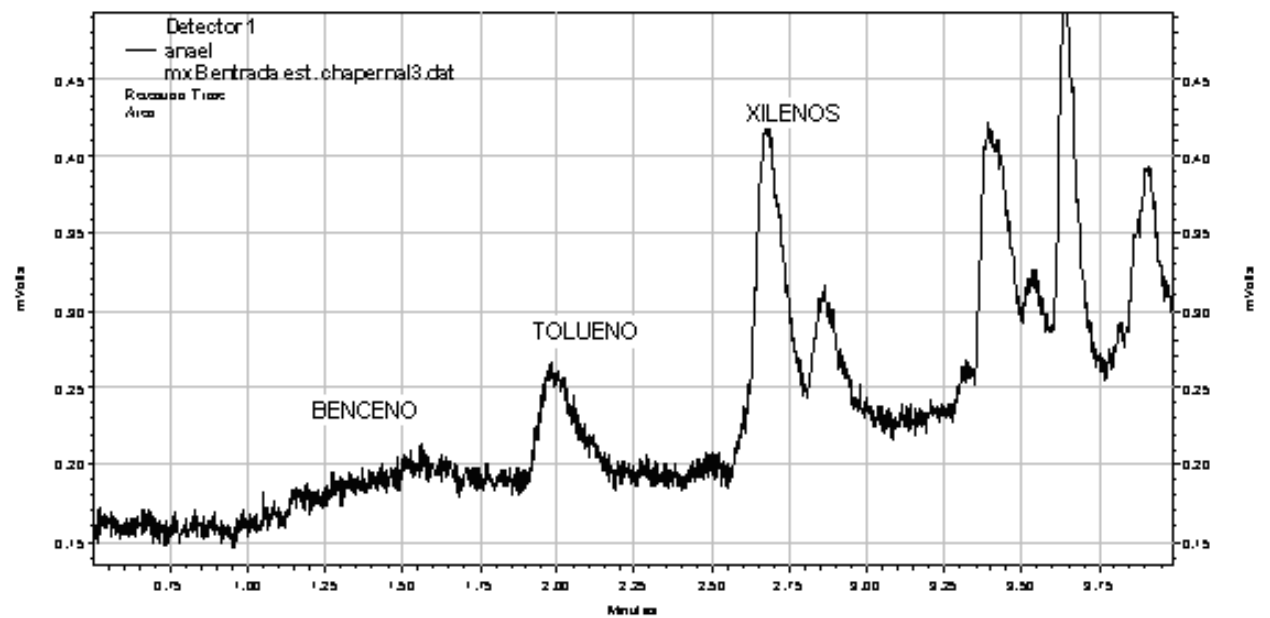
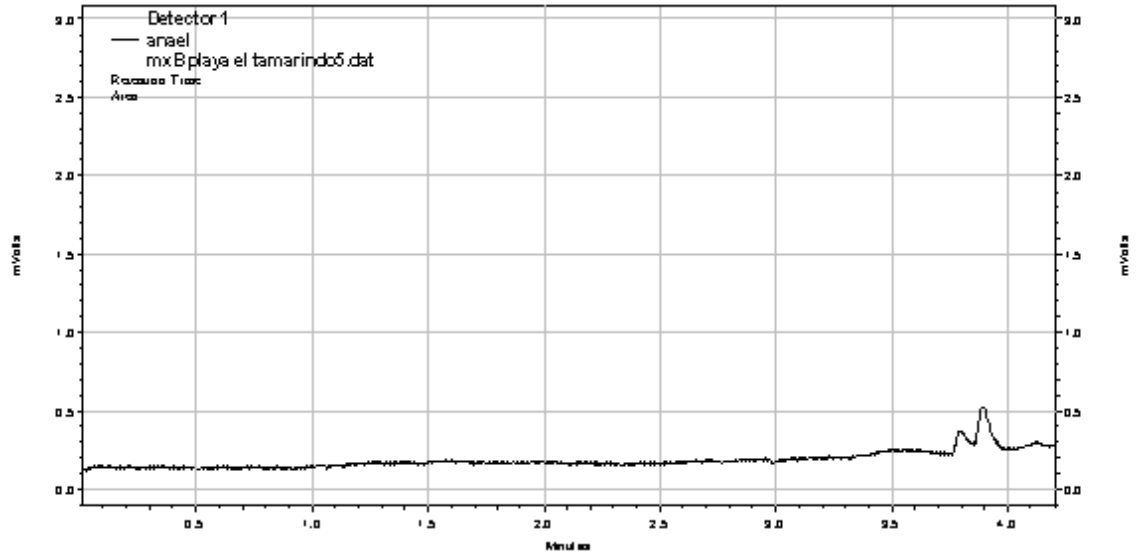


Figura 3.20 Cromatograma del punto de muestreo ubicado en La Playa El Tamarindo



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1. Las condiciones óptimas para el uso de la fibra de Microextracción en Fase Sólida (SPME) con los analitos BTX son:

- La temperatura óptima de muestra para la adsorción de los analitos en la fibra SPME es de 30 °C.
- El tiempo óptimo de agitación de la muestra para la adsorción de BTX es de 5 minutos.
- El tiempo óptimo de desorción de BTX de la fibra de SPME es de 5 minutos.
- En la desorción la temperatura óptima es de 225 °C.

2. El parámetro de linealidad para la determinación de BTX se cumple utilizando el método 8260B bajo las condiciones de trabajo empleadas en el rango de concentración de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/L de BTX utilizando curvas de adición estándar.

3. Por medio del parámetro de repetibilidad se estableció que el método es preciso aplicado por el mismo analista.

4. El método detecta concentraciones de benceno desde 0.03 mg/L con desviación estándar de blanco 0.003 y se puede cuantificar desde 0.05 mg/L; detecta tolueno en concentraciones desde 0.02 mg/L con desviación estándar de blanco 0.003 y se puede cuantificar desde 0.05mg/L; finalmente se puede detectar concentraciones de xilenos desde 0.03 mg/L con desviación estándar de blanco 0.006 y se cuantifica desde 0.07 mg/L. Con grado de significancia del 5% de acuerdo a la t de student.

5. Los cálculos del porcentaje de recobro, utilizando curvas de calibración con adición estándar se efectuó con una muestra de agua del estero El Tamarindo presentando un promedio de 112.53% para benceno; 110.63% para tolueno y

106.03% para xilenos con lo que se establece que el método es exacto para los niveles de concentración mencionados.

6. Los valores de pH, conductividad y salinidad se encuentran en los valores estándares para aguas marinas y el oxígeno disuelto se encontró cercano al valor establecido por la norma técnica de calidad ambiental para un cuerpo de agua superficial que debe ser por lo menos 5mg/L de oxígeno disuelto, excepto por los puntos que presentan los resultados siguientes: Playa El Cuco = **4.30**, Playa El Icacal = 4.58, Playa Las Tunas = **4.15**, Playa Negra = 4.66, Los jotes = 4.73, Estero Ramaditas = 4.93, Playa El Tamarindo = **4.0**, Entrada a Estero El Tamarindo = **4.16**.

7. Se encontró concentraciones de **benceno, tolueno y xilenos** entre el límite de detección y en el límite de cuantificación.

RECOMENDACIONES

Es recomendable hacer monitoreos frecuentes en el Golfo de Fonseca para conocer el estado en que se encuentra y evitar la contaminación provocada por la actividad marítima y portuaria que se intensificará posteriormente.

Se deben establecer medidas efectivas para evitar las descargas de desecho de todo tipo en el Golfo de Fonseca y en los ríos que desembocan en el mismo.

Es necesario establecer una normativa de calidad ambiental por los organismos correspondientes, ya que la norma del CONACYT es general y no es específica para cuerpos de agua salada.

Se recomienda hacer muestreos en época de verano ya que este estudio se realizó en época de invierno, para darle continuidad al estudio del estado actual del Golfo de Fonseca.

BIBLIOGRAFIA.

1. M. Murata, M. Tsujikawa and S. Kawanishi. Oxidative DNA Damage by Minor Metabolites of Toluene May Lead to Carcinogenesis and Reproductive Dysfunction, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 261, (478-483), 1999.
2. M. S. Hutcheson, D. Pedersen, N. D. Anastas, J. Fitzgerald and D. Silverman. Beyond TPH: Health-Based Evaluation of Petroleum Hydrocarbon Exposures, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 24, (85-101), 1996.
3. L. M. L. Nollet, *Handbook of Water Analysis*, Marcel Dekker, Inc. United States of América, (1-41); (721-752), 2000.
4. M. A. Mottaleb, M. Z. Abedin, Determination of Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylene in River Water by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography, *Analytical Sciences*, Vol. 19 (1365-1369), 2003.
5. International Programme on Chemical Safety and the Commission of the European Communities ©IPCS, CEC, 2005.
6. H. Prosen, L. Zupaňčic-Kralj, Solid – phase Microextraction, *Anal. Chem.* Vol. 18, No 4, (272-281), 1999.
7. C. Baird. *Química Ambiental*. Editorial Reverté S. A., 2001.
8. C. Fernández, M. Trinidad. Estudio Analítico de Compuestos volátiles en vino. Caracterización quimiométrica de distintas denominaciones de origen. Universidad de la Rioja, Marzo de 2004.
9. U. S. Environmental Protection Agency, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical / Chemical Methods; 8260B Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography / Mass Spectrometry (GC / MS), (1-86).
<http://www.epa.gov/sw-846/pdfs/8260b.pdf>

10. Sh. Wilbur, M:A, Division of Toxicology ATSDR, Atlanta, GA
S. Bosch, B.S, Syracuse Research Corporation, Syracuse, NY.
U. S Departmente of Health and Human Services
Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Mayo
2004.
11. D.A. Skoog. Química Analítica. 7ª edición. M. C. Ramírez M. y R.
Zugazagoitia H, traductoras. Mcgraw – Hill Interamericana editores S.A. de C.V. DF,
México, 2001 .
12. J. C Miller y J. N Miller. Estadística para Química Analítica. R. Izquierdo H.
Y C. Maté J, traductores. 2ª edición. Addison Wesley Iberoamericana. Delaware,
EUA. 1993.
13. P. L. Massart y otros investigadores. Chemometrics: a text book. Elsevier
Science Publishers R. V.1998.
14. Massart, D. L. Handbook of Chemiometrics and Qualimetrics. *Parte A. Data
Handling in Science and Technology*. Elsevier. 1997.
15. M. B. Matta, D. McKinnie, E. Barraza, J. Sericano. Hurricane Mitch.
Reconstruction/Gulf of Fonseca. Contaminant Survey and Assessment, Texas (1-46)
2002.
16. International Union of Pure Applied Chemistry (IUPAC). Compendium of
Chemical Terminology. (Documento web). 1995.
17. Arkin, H. Y Colton, R: R: 1960 (Tablas para estadistas). Tables for Staticians.
Collage Outline Series. Barners & Noble, INC. New York, EUA.
18. Miller, N. J. y Miller, 1ª edición en español, Pearson Educación S. A.,
Madrid, 2002.

19. F. Vasquez G., H. Dorantes V., H. A. Valdez, A. Frausto C. Estudio Hidrológico de las Aguas Costeras, frente a las bocas de la laguna de terminos, campeche. En dos épocas climáticas diferentes. Contribución No 633, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, México, 1987.
20. Curso de Oceanografía Física, Universidad de Flinders, Australia, 2000
21. M. K. Hill. Understanding Environmental Pollution 4. Press Cambridge, 2004
22. Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Agencia de Cooperación Internacional del Japón. Estudio para el Establecimiento del sistema de Monitoreo de la Calidad de las aguas en el Golfo de Fonseca, marzo, 2006.
23. Programa Ambiental Regional para Centroamérica y Sistema de Gestión para el Medio Ambiente (PROARCA/SIGMA), Contaminación por Plaguicidas en las Cuencas Hidrográficas que desembocan en el Golfo de Fonseca y Oportunidades para su Prevención y Mitigación, septiembre 2002.
24. Guía técnica de Atenuación Natural Monitorizada en emplazamientos contaminados. Técnicas de bioaumentación para la potenciación de la biodegradación de contaminantes.
25. X. M. Doménech, Química Ambiental. El impacto Ambiental de los Residuos. S.A. ediciones, Madrid. 1994
26. T. Dickson, Química Enfoque Ecológico. Editorial Limusa, México DF. 1986
27. S. E. Manahan, Environmental Chemistry. Lewis Publishers. U.S.A. 1994.
28. J. Serricano and T. L. Wade Chemical Analysis Support and Training for NOAA/NOS Hurricane Mitch Reconstruction Efforts (64-75) 2000.
29. Informe Técnico “Estudio Socioambiental de la comunidad El Tamarindo, Conchagua, La Unión, El Salvador”. 1998-2005

30. Hong – When Chen, Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water by Solid-Phase Microextraction and Liquid Chromatography, *Analytical Sciences* Vol. 20, (1383- 1388), 2004
31. S. M. Pendergas, NIOSH/DART, Manual of Analytical Methods (NMAM) Hydrocarbons, Aromatic Method 1501, Fourth Edition, Issue 3 (1-7) 2003.
32. SUPELCO. Solid Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions, Bulletin 923 (1-5), 1998.
33. Z. Zhang and J. Pawliszyn, Head space Solid-Phase Microextraction, *Anal. Chem.* Vol. 65 (1843-1852) Waterloo, Ontario, Canada`.1993
34. A. Serrano, M.Gallego, Direct screening and confirmation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in water, *J. Chromatogr. A* 1045 (181-188), Spain, 2004.
35. C. M. M. Almeida and L. V. Boas Análisis of BTEX and other substituted benzenes in water using headspace SPME–CG-FID method validation, *J. Environ. Monit.* 6(1), (80-88) 2004,
36. T. C. Schmidt, S. B. Haderlein., R. Pfister., R. Forster, Occurrence and fate modelling of MTBE and BTEX compounds in a Swiss Lake used as drinking water supply, *Water Research.* 38 (1520-1529) 2004
37. M. Rosell., S. Lacorte, A.Ginebra., D. Barceló. Simultaneous determination of methyl tert-butyl ether and its degradation products other gasoline oxygenates and benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in Catalonian ground water by purge and trap-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 995, (171-184), 2003
38. L. Zwank, T. C. Smidt, S. B. Haderlein, and M. Berg, Simultaneous Determination of Fuel Oxygenates Chromatography-Mass Spectrometry (DAI-GC/MS), *Environ. Sci. Technol.* 36,(2054-2059), 2002.

39. F. Bianchi, M. Careri, E. Marengo, M. Msci, Use of experimental design for the purge-and-trap-gas chromatography-mass spectrometry determination of methyl tert-butyl ether, tert-butyl alcohol and BTEX in groundwater at trace level, *J. Chromatogr. A*, 975, (113-121), 2002.
40. R. Kubinec, V. G. Berezkin, R. Gèrovà, G. Adobbà, H. Mračnová, L. Soják. Needle Concentrator for gas Chromatographic determination of BTEX in aqueous samples, *J. Chromatogr. B*. 800 (295-301), 2004.
41. Centro Regional de Estudios y Educación Ambiental, Universidad de Antofagasta, Chile. Informe de Contaminación por Hidrocarburos en la Zona Costera de la Ciudad de Antofagasta, Chile, Abril, 2005
42. S.J. Johnson^{a,*}, K.J. Woolhouse^a, H. Prommer^a, D.A. Barry^a, Christofi^b, Contribution of anaerobic microbial activity to natural attenuation of benzene in groundwater, *E. Geology*, 70 (343-349), 2003.

