

## **Verificación interna y aplicación del método oficial para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en sedimentos**

Internal verification and application of the official method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in sediments

M.Sc. Orlando Manuel Viera Ribot<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9735-0431>

Dr. C. Sergio Morales Fernández<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8395-0084>

<sup>1</sup>Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos, Cienfuegos, Cuba

<sup>2</sup>Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, Villa Clara, Cuba

\*Autor para la correspondencia. correo electrónico: oviera@gestion.ceac.cu

### **RESUMEN**

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son considerados contaminantes orgánicos persistentes en el medio ambiente. Por su toxicidad, algunos de ellos son catalogados como cancerígenos en humanos. En este trabajo se asimilaron los procedimientos correspondientes a la metodología US EPA 8100 y se desarrolló la verificación interna del método analítico por cromatografía gaseosa, combinado con la extracción asistida con ultrasonidos, para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en sedimentos. Para la verificación del método analítico se siguió lo establecido en la NC TS 368: 2010. El método resultó ser lineal, preciso y exacto. Mediante el empleo del método verificado se estudió la contaminación de sedimentos del embalse Hanabanilla, mostrando presencia de Antraceno, Fenantreno y Criseno de origen pirogénico, así como en la desembocadura de los ríos Salado y Damují hacia la bahía de Cienfuegos, donde fue posible cuantificar 7 de los 15 HAPs en estudio.

**Palabras clave:** hidrocarburos aromáticos policíclicos, contaminación en sedimentos, validación de métodos analíticos.

## **ABSTRACT**

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are considered persistent organic pollutants in the environment. Due to their toxicity, some of them are classified as carcinogenic to humans. In this work, the procedures corresponding to the US EPA 8100 methodology for the determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in sediments, based on gas chromatography analysis after ultrasound-assisted extraction, have been assimilated and internally verified. Method verification was carried out according to NC TS 368: 2010. The method proved to be linear, precise and exact. Once verified, the method was used to study the contamination of sediments from Hanabanilla nab (presence of anthracene, phenanthrene and chrysene of pyrogenic origin was found), as well as at the mouth of Salado and Damují rivers towards the Cienfuegos bay, where seven of the fifteen studied PAHs were found.

**Keywords:** polycyclic aromatic hydrocarbons, sediments pollution, methods validation.

Recibido: 12/6/2020

Aprobado: 18/9/2020

## **Introducción**

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) son moléculas de dos o más anillos aromáticos fusionados de reconocida capacidad carcinogénica. Su presencia en la atmósfera, suelo, sedimentos, plantas y animales marinos hace que la exposición del hombre a los mismos sea inevitable.<sup>(1)</sup> La contaminación por HAPs en su mayoría, tiene un origen antropogénico, estos se originan de la combustión incompleta o pirólisis de la materia orgánica. Una vez liberados en la

zona de combustión en forma de vapores, debido a sus bajas presiones de vapor, se condensan sobre partículas de hollín.<sup>(2)</sup>

Pueden ingresar al ecosistema marino a través de la atmósfera, descargas o vertidos directos, mediante lixiviado de suelos circundantes, deposición atmosférica y por biosíntesis.<sup>(3)</sup> Dentro de los ambientes acuáticos, los HAPs sufren una serie de procesos de intemperización (físicos, químicos y biológicos), mediante los cuales se asocian fácilmente con la materia particulada y finalmente se depositan en el sedimento.<sup>(4)</sup> Como consecuencia, los sedimentos actúan como reservorios o registros de estos contaminantes. Además, por su persistencia natural a la degradación, los HAPs permanecen invariables como testigos de los procesos que le dieron origen.<sup>(5,6)</sup>

Las ventajas de analizar los sedimentos como matriz ambiental, en lugar de la biota o el agua, para explicar el comportamiento de estos contaminantes es que los concentran por períodos más largos. Además, los sedimentos son estáticos, su análisis es más simple, son relativamente fáciles de coleccionar y de extraer los analitos de interés, así como para repetir los análisis en los mismos sitios de interés, lo que permite estudiar las tendencias de la contaminación por períodos de tiempo específicos. El estudio de los sedimentos también puede aportar información sobre áreas con tendencia a la acumulación de contaminantes y brindar datos del estado previo a un evento antropogénico, es decir, contienen el registro del nivel base de compuestos de interés, su variabilidad y la influencia que tienen en un ecosistema.<sup>(7,8)</sup>

Existen varias técnicas para extraer HAPs desde sedimentos.<sup>(1,9-10)</sup> Una de ellas implica someter la muestra a un tratamiento con ultrasonidos, mediante inmersión en un baño que produce una cavitación del disolvente alrededor de las partículas de la matriz, aumentando el contacto con el disolvente y mezclándolo con la muestra. Normalmente, para muestras granulares como suelos y sedimentos <sup>(11)</sup> se utilizan como disolventes el cloruro de metileno, n-hexano y acetona. Esta técnica permite la extracción de un número considerable de muestras con un costo relativamente bajo.<sup>(12)</sup> Con este método de extracción se obtienen recuperaciones comparables a otros procedimientos convencionales, para determinados analitos y a partir de diversas matrices <sup>(9)</sup>, aunque normalmente no son superiores a las obtenidas utilizando el método Soxhlet.<sup>(13)</sup>

La mayor parte de los HAPs pueden ser cuantificados por cromatografía de gases (GC), incluidos aquellos que han sido clasificados por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) como contaminantes prioritarios.<sup>(14)</sup> Los detectores más empleados para el análisis de HAPs por GC son: ionización por llama (*Flame Ionization Detector*, FID)<sup>(15)</sup> y principalmente el de espectrometría de masas (*Mass Spectrometry*, MS).<sup>(16-17)</sup>

El presente trabajo tiene como propósito implementar un método analítico que incluya metodologías de separación y concentración para identificar y cuantificar los 15 (HAPs) reconocidos como contaminantes prioritarios en sedimentos. Para ello es necesario asimilar el método estandarizado US EPA 8100 para la determinación de (HAPs), que utiliza la extracción asistida con ultrasonidos y la determinación por Cromatografía de Gases. La asimilación de dicho método requirió someterlo a un proceso de verificación interna, de acuerdo con la normativa cubana vigente, para lo cual se empleó un sedimento de referencia certificado. Finalmente se estudió la contaminación por HAPs en muestras de sedimentos del embalse Hanabanilla y la bahía de Cienfuegos.

## **Materiales y métodos**

### **Equipos y materiales**

Las determinaciones se realizaron en un cromatógrafo de gases marca SHIMADZU GC-2007, con autoinyector SHIMADZU AOC-20i y detector de ionización por llama. Para las extracciones se utilizó un baño ultrasónico SONOREX RK 52 (Berlín, Germany). Toda la cristalería y el equipamiento utilizado en el análisis fueron verificados y calibrados por la Oficina Territorial de Normalización de Villa Clara (OTN). Los reactivos empleados fueron de calidad cromatográfica, así como los disolventes empleados de calidad HPLC. Las disoluciones de referencia se prepararon a partir de un ampula certificada (SUPELCO, U-97940. Supelco Analytical) de concentración 10µg/mL de cada uno de los HAP en estudio. También se dispuso de un sedimento certificado (IAEA – 417)<sup>(18)</sup> proporcionado por la Agencia Internacional de Energía Atómica.

## Extracción de las muestras de sedimentos

El método estandarizado US EPA 8100 consta de cinco etapas.<sup>(15)</sup> La primera es el pretratamiento de la muestra y consta de los procesos de secado y tamizado, lo cual se realizó siguiendo los estándares del método US EPA 610.<sup>(19)</sup> La etapa de extracción asistida con ultrasonido se llevó a cabo teniendo en cuenta el procedimiento US EPA 3550C.<sup>(20)</sup> La purificación del extracto se realizó de acuerdo con la metodología descrita en el método US EPA 3630a.<sup>(21)</sup>

## Análisis de los extractos por Cromatografía de Gases

Para la determinación de los HAPs por GC se empleó un cromatógrafo (SHIMADZU 2010) con detector de ionización por llama (FID), columna capilar SH-RtxTM-5 de 30 m x 0,25 mm ID. x 0,25 µm, nitrógeno como gas portador, a un flujo de 50 mL/min y una velocidad de flujo de 25,6 cm/segundo. Se utiliza un autoinyector automatizado, con inyección en modo *splitless* o sin división de flujo. Para la separación cromatográfica se estableció el programa de temperatura siguiente: 80 °C por 5 min, incremento a razón de 8,4 °C/min hasta 300 °C, mantener a 300 °C por 20 min.

## Cálculo y expresión de los resultados

El contenido de cada HAPs en µg/g, se determina de la siguiente manera:

$$C = (m * (A_c - A_b) + b) * D * V_{ext} / W \quad (1)$$

donde

C es la concentración de analito (en ng/g)

m es la pendiente de la curva de calibración correspondiente

b es el intercepto de la curva de calibración

Ac: Área de la señal del analito en el cromatograma, en µV, Ab es el área de la señal del blanco, en µV

Vext: Volumen final del extracto, en mL

D es el factor de dilución

W es el peso de la muestra inicial, en g

### Verificación del método

Para seleccionar los parámetros de calidad del método analítico que deben ser evaluados, se procedió según la Norma Cubana Especificación Técnica TS 368. <sup>(22)</sup> La misma establece que la magnitud de una verificación interna a ser realizada localmente, en un laboratorio, depende de cuan completamente el método haya sido validado externamente. En base a eso, la norma clasifica los métodos de análisis en 6 categorías, dependiendo del grado de validación que se haya documentado.

En este caso concreto, al tratarse de un método previamente estandarizado como es el US EPA 8100, el alcance de la verificación interna que corresponde consiste en comprobar la veracidad, la precisión y los límites de cuantificación.

Para evaluar los parámetros de calidad del método durante la verificación interna se procedió de la siguiente forma:

**Linealidad:** se prepararon disoluciones a seis niveles de concentración dentro del intervalo de trabajo del método y se realizaron cuatro réplicas para cada caso. Cada disolución se inyectó por duplicado. Para cada analito, el intervalo de concentraciones de la curva de calibración se seleccionó de manera que el nivel de concentración más bajo fuera superior a su límite de cuantificación, mientras que el nivel más alto lo determinó la concentración de HAPs en la disolución patrón utilizada. Ver tabla 1.

Para evaluar la linealidad se realizó un análisis de varianza (ANOVA) en base a verificar la falta de ajuste del modelo. El ajuste al modelo lineal se probó con un nivel de significación del 95 % mediante la comparación del estadígrafo calculado F con  $F_{\alpha}(k-2, n-k)$ , donde k es el número de niveles de concentración (6) y n es el número total de observaciones. Si F calculado es menor que  $F_{0,05}(4, 22) = 3,88$ , la variabilidad debida a la falta de ajuste no es significativa y el modelo lineal explica la variabilidad de los datos.

**Tabla 1** - Niveles de concentración elegidos para el estudio de linealidad

Compuestos	Niveles de concentración (µg/g)					
	1	2	3	4	5	6
Naftaleno	0,09	0,43	1,10	2,20	5,28	9,80
Acenaftileno	0,12	0,48	0,91	2,19	4,73	10,09
Acenafteno	0,09	0,44	0,89	1,78	4,66	9,84
Fluoreno	0,13	0,39	0,89	2,23	4,85	10,02
Fenantreno	0,13	0,42	0,81	2,20	4,86	10,01
Antraceno	0,12	0,36	0,83	2,12	4,83	10,03
Fluoranteno	0,11	0,38	0,88	2,21	4,84	10,04
Pireno	0,12	0,45	0,85	2,20	4,67	10,11
Benzo(a) Antraceno	0,12	0,45	0,86	2,24	5,19	9,88
Criseno	0,09	0,42	0,93	2,25	5,24	9,85
Benzo(b) Fluoranteno	0,22	0,45	0,87	2,21	4,99	9,92
Benzo(k) Fluoranteno	0,09	0,48	0,95	2,05	4,96	9,96
Benzo(a) Pireno	0,09	0,46	0,85	2,17	5,32	9,75
Indeno(1,2,3-cd) Pireno	0,14	0,43	0,80	2,20	4,80	10,03
Benzo(g,h,i) Perileno	0,11	0,42	0,91	2,15	4,85	9,98

**Exactitud o veracidad:** para la evaluación de este parámetro se empleó un sedimento de referencia certificado, que contenía a los 15 HAPs en estudio, a concentraciones dentro del intervalo de trabajo seleccionado para cada uno /11/. Se procesaron 8 réplicas empleando la extracción asistida con ultrasonidos y se calculó la recuperación según:

$$R = \frac{Q_{hallada}}{Q_{original}} \quad (2)$$

donde

R es la recuperación

$Q_{hallada}$  la cantidad del analito recuperado después de procesar la muestra y  $Q_{original}$  es el valor certificado de concentración.

Para evaluar las recuperaciones se utilizó, como criterio de comparación, el intervalo de 75-120 %, el cual se considera como aceptable para el caso de métodos cromatográficos.<sup>(23)</sup> Igualmente,

para cada caso se calculó el coeficiente de variación o RSD %, que se considera como aceptable cuando el valor calculado es inferior al 16 %.<sup>(22)</sup>

**Precisión:** se analizaron los parámetros repetibilidad y precisión intermedia. Para el estudio de repetibilidad se procesaron 8 réplicas del sedimento de referencia utilizado en el apartado anterior.<sup>(18)</sup> Las extracciones asistidas con ultrasonidos fueron realizadas todas a la vez, por el mismo analista y en el mismo día. En paralelo se procesó un blanco bajo las mismas condiciones. Para la precisión intermedia se procesaron 10 réplicas del mismo sedimento. Las extracciones fueron realizadas por 3 analistas en días diferentes.

El desempeño de la repetibilidad y la precisión intermedia fue evaluado a partir de los resultados del coeficiente de variación para cada compuesto.

**Límite de detección y cuantificación:** Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se obtuvieron a partir de la medición de un mínimo de 10 réplicas de un sedimento, tomado de una zona no contaminada con HAPs o que no ha sufrido impactos directos de este tipo de contaminantes. En este caso se realizó el pretratamiento anteriormente descrito, se procedió a la extracción mediante baño ultrasónico y a su posterior determinación por GC-FID. El cálculo de los límites de detección y cuantificación para cada compuesto fue realizado según lo propuesto en <sup>(23)</sup>, específicamente para métodos cromatográficos.

**Límites de detección (LD):**  $LD = \bar{x} + 3 * \sigma$  (3)

**Límites de cuantificación (LC):**  $LC = \bar{x} + 10 * \sigma$  (4)

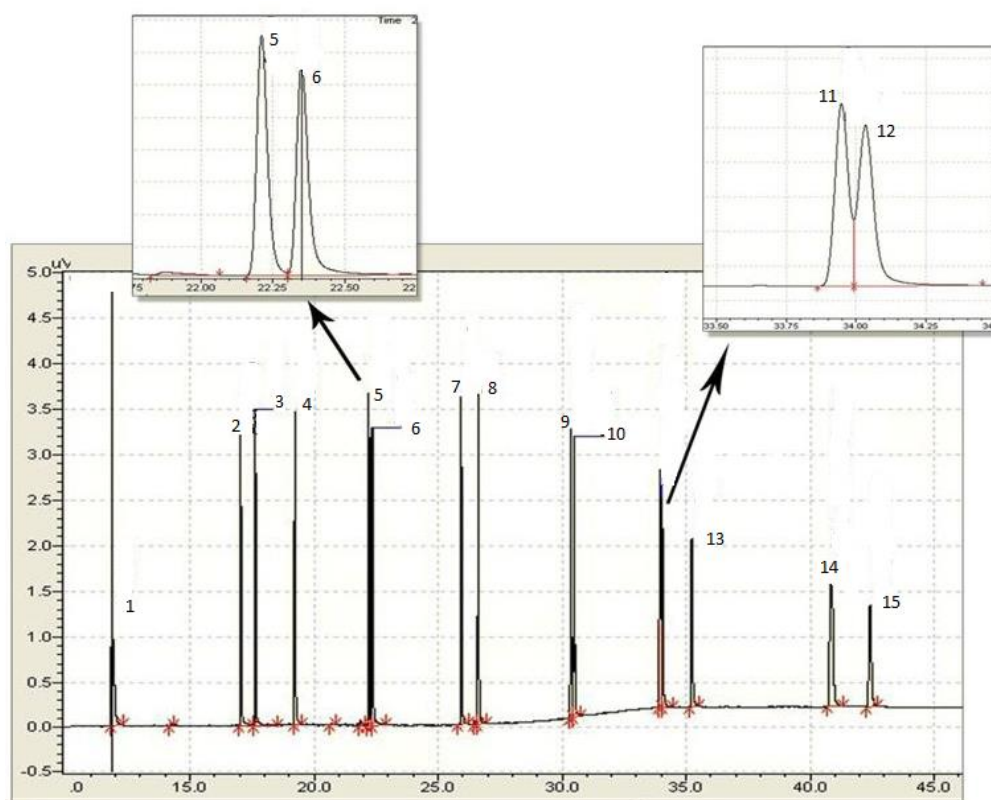
donde

$\bar{x}$  es el valor medio de las respuestas del blanco y  $\sigma$ , su Desviación Estándar.



## Resultados y discusión

La inyección en el Cromatógrafo de gases de una disolución de referencia que contenía a los 15 HAPs en estudio, analizados bajo las condiciones operacionales establecidas en el método estandarizado US EPA 8100, dio como resultado el cromatograma que se muestra en la figura 1. De manera general se alcanza una adecuada resolución de los picos cromatográficos, excepto para los pares de isómeros, Fenantreno-Antraceno y Benzo(b)Fluoranteno-Benzo(k)Fluoranteno. Es conocido que la separación de isómeros por cromatografía de gases suele ser un problema de gran complejidad, no obstante, como se muestra en la figura ampliada, con el nivel de resolución alcanzado es posible determinar el área correspondiente a cada señal, con vistas a la determinación cuantitativa de cada uno de los compuestos.



**Fig. 1** - Cromatograma correspondiente a la mezcla de los 15 HAPs en estudio. (1) Naftaleno, (2) Acenaftileno, (3) Acenafteno, (4) Fluoreno, (5) Fenantreno, (6) Antraceno, (7) Fluoranteno, (8) Pireno, (9) Benzo(a) Antraceno, (10) Criseno, (11) Benzo(b) Fluoranteno, (12) Benzo(k) Fluoranteno, (13) Benzo(a) Pireno, (14) Indeno(1,2,3-cd) Pireno y (15) Benzo(g,h,i) Perileno.

## Verificación del método

### Comprobación de la linealidad

Teniendo en consideración las concentraciones esperadas de los analitos de interés en las muestras y los valores de la recuperación para cada uno, se estableció el intervalo de concentraciones para estudiar el comportamiento de la linealidad en cada caso. En la tabla 2 se muestra este intervalo para cada compuesto en estudio.

**Tabla 2** - Intervalo de concentraciones para el estudio de linealidad

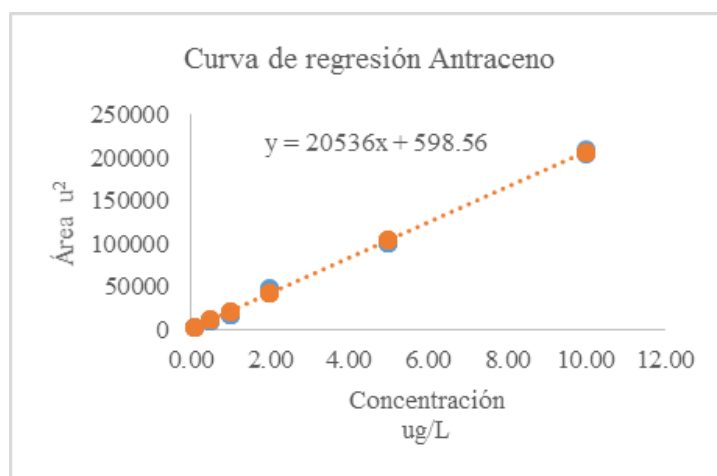
Analitos	Concentraciones (µg/L)	
	Límite inferior	Límite superior
Naftaleno	0,09	9,98
Acenaftileno	0,12	10,09
Acenafteno	0,09	9,84
Fluoreno	0,13	10,02
Antraceno	0,13	10,01
Fenantreno	0,12	10,03
Fluoranteno	0,11	10,04
Pireno	0,12	10,11
Benzo(a)Antraceno	0,12	9,88
Criseno	0,09	9,85
Benzo(b)Fluoranteno	0,10	9,92
Benzo(k)Fluoranteno	0,09	9,96
Benzo(a)Pireno	0,09	9,75
IndenoPireno	0,14	10,03
Benzo(ghi)Perileno	0,11	9,98

En la tabla 3, se muestran los resultados obtenidos del análisis de regresión, así como los principales estadígrafos obtenidos a partir de la correlación de la señal analítica (unidades de área de los picos cromatográficos) con la concentración a cada nivel, dentro del intervalo de trabajo.

**Tabla 3** - Resultados del análisis de regresión.

Análisis de regresión						
Compuesto	a	b	Anova		r	R <sup>2</sup>
			F <sub>crítico</sub>	F <sub>calculada</sub>		
Naftaleno	14525	7503	3,48	2,439 7	0,998	0,996
Acenaftileno	20142	472,49		2,716 5	0,997	0,995
Acenafteno	21009	2567		0,530 8	0,999	0,999
Fluoreno	20723	922,02		2,824 0	0,998	0,997
Antraceno	20536	598,56		2,857 7	0,998	0,996
Fenantreno	20670	498,11		2,231 0	0,998	0,996
Fluoranteno	21761	428,10		2,312 9	0,999	0,998
Pireno	21178	868,33		2,865 2	0,998	0,996
Benzo(a)Antraceno	19936	619,18		2,440 5	0,998	0,997
Criseno	19936	1552,39		2,795 7	0,999	0,998
Benzo(b)Fluoranteno	20635	309,85		1,514 5	0,999	0,997
Benzo(k)Fluoranteno	19892	2193,94		2,530 4	0,998	0,997
Benzo(a)Pireno	18275	1104,97		2,563 1	0,997	0,994
IndenoPireno	33018	-2068,8		2,290 7	0,997	0,993
Benzo(ghi)Perileno	22905	8,49		1,801 4	0,997	0,993

Un primer criterio cualitativo para evaluar la calidad del ajuste es observar visualmente la medida en que los datos se ajustan a un modelo, es decir, si en este caso los puntos tienden a ajustarse razonablemente bien a una línea recta, tal como se muestra en la figura 2, que a modo de ejemplo, representa la curva de calibración obtenida para el Antraceno.



**Fig. 2** - Curva de calibración para Antraceno

Un criterio cuantitativo para evaluar la linealidad lo proporciona el coeficiente de correlación. En todos los casos, los valores de  $R^2$  superiores a 0,99 obtenidos indican que los modelos lineales ajustados explican el 99 % de la variabilidad. Esto expresa que la calidad de los ajustes es satisfactoria y que, por ello, para todos los analitos, la relación matemática entre señal analítica (área debajo de los picos de cada compuesto) y niveles de concentración de la curva de calibración, es descrita adecuadamente por una línea recta. El coeficiente de correlación igual o superior a 0,99, indica una relación lineal estadísticamente significativa entre las variables. Esto se corresponde con uno de los criterios de aceptación establecidos para el análisis de trazas y con uno de los requerimientos planteados en la norma TS 368: 2010.<sup>(22)</sup>

La prueba de falta de ajuste o de Tiley <sup>(22)</sup> está diseñada para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados, o si se debería utilizar un modelo más complicado. Los resultados de esta prueba para el conjunto de HAPs en estudio se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4** - Resultados del análisis de regresión. Prueba de falta de ajuste

Compuesto	MR-IAEA-417	C <sub>media</sub>	Recob <sub>medio</sub>	S% recuperación	CV%	T <sub>Calc.</sub>	T <sub>Crítica</sub>
	µg/g		%Recob				
Naftaleno	0,150	0,145	96,33	7,216	7,49	1,437	
Acenaftileno	0,042	ND	-	-	-	-	
Acenafteno	0,180	0,169	93,89	6,492	6,92	2,662	
Fluoreno	0,230	0,222	96,52	3,973	4,12	2,476	
Fenantreno	3,900	3,893	99,82	4,513	4,52	0,110	
Antraceno	0,630	0,576	91,50	10,410	9,38	2,308	
Fluoranteno	7,700	7,892	102,49	2,826	2,76	2,490	
Pireno	6,000	6,467	107,78	7,897	7,33	2,787	3,49
Benzo(a) Antraceno	3,200	3,225	100,77	4,336	4,30	0,504	
Criseno	3,600	3,753	104,26	5,719	5,75	0,835	
Benzo(b) Fluoranteno	4,100	3,956	96,49	5,595	5,79	1,775	
Benzo(k) Fluoranteno	2,000	2,212	110,60	6,931	6,67	1,515	
Benzo(a) Pireno	2,800	2,707	96,69	7,218	7,47	1,295	
Indeno(1,2,3-cd) Pireno	2,700	2,915	107,96	8,289	7,68	2,716	
Benzo(g,h,i) Perileno	2,300	2,246	97,65	4,619	4,73	1,439	

En todos los casos el valor del estadígrafo calculado ( $T_{calculado}$ ) fue inferior a 3,49 (valor crítico), por lo tanto, la variabilidad debida a la falta de ajuste no es significativa y el modelo lineal explicó la variabilidad de manera satisfactoria. El análisis de los datos experimentales no sugirió la necesidad de considerar modelos superiores al primer orden por lo que se concluye que la correlación es lineal es la adecuada.

### **Veracidad**

La tabla 4 también contiene los valores de recuperación media obtenidos a partir de las 8 réplicas analizadas, así como los niveles de concentración certificados para cada uno de los analitos en el material de referencia. Un primer criterio de la fiabilidad de los resultados obtenidos en este ensayo se expresa en los altos valores de recuperación obtenidos, todos en el intervalo entre 85 y 110 %. Con esto se cumple el criterio de aceptación establecido para métodos cromatográficos, cuando se trabaja a concentraciones del orden de  $10^{-6}$ .<sup>(23)</sup> Otro de los criterios evaluados en el ensayo de veracidad fue el coeficiente de variación. Como se aprecia en la Tabla 4, sexta columna, para todos los analitos el coeficiente calculado fue inferior al 16%, que es el valor de referencia establecido en la normativa vigente, cuando se trabaja a concentraciones del orden de  $10^{-6}$ .<sup>(22)</sup> Como complemento al análisis de veracidad según la metodología de verificación interna propuesta por la normativa empleada, se realiza una prueba-t para determinar si hay diferencia significativa o no, entre los resultados reportados en el material de referencia certificado y aquéllos obtenidos por el método a verificar. Para esta prueba se plantea la prueba-t, donde sí:  $t_{calculada} < t_{crítica}$ , los resultados observados no presentarán diferencias significativas respecto al material de referencia y viceversa. Todos los valores obtenidos fueron inferiores al tabulado de 3,49 (tabla 4), lo cual indica que no hay diferencias significativas entre los resultados de concentración obtenidos por el método internamente verificado y los reportados para el material certificado.

## Estudio de la precisión del método

### Repetibilidad

Se evaluaron los coeficientes de variación de los resultados obtenidos para cada compuesto en el análisis de 10 réplicas de un material de referencia, en condiciones de repetibilidad. Como se observa en la tabla 5, los resultados cumplen con lo establecido en la normativa como criterio de variabilidad entre replicas, es decir, que el valor obtenido de CV sea menor al 11% cuando se trabaja con concentraciones del orden de  $10^{-6}$ , aunque valores inferiores a 21% pueden considerarse aceptables.<sup>(22)</sup>

**Tabla 5** - Resultados obtenidos del análisis de repetibilidad

Compuesto	C <sub>MR-IAEA-417</sub>	C <sub>media</sub>	CV%
	(µg/g)		
Naftaleno	0,150	0,142	4,91
Acenaftileno	0,042	0,037	7,93
Acenafteno	0,180	0,165	7,91
Fluoreno	0,230	0,202	6,97
Fenantreno	3,900	3,891	4,49
Antraceno	0,630	0,577	11,3
Fluoranteno	7,700	7,881	2,49
Pireno	6,000	6,311	6,71
Benzo(a) Antraceno	3,200	3,200	3,90
Criseno	3,600	3,575	5,37
Benzo(b) Fluoranteno	4,100	3,945	5,62
Benzo(k) Fluoranteno	2,000	2,071	6,31
Benzo(a) Pireno	2,800	2,704	7,38
Indeno(1,2,3-cd) Pireno	2,700	2,827	5,47
Benzo(g,h,i) Perileno	2,300	2,220	3,81

### Precisión Intermedia

Los resultados fueron obtenidos a partir del análisis de un sedimento certificado, realizado en días y por analistas diferentes. Se utilizó el coeficiente de variación como criterio de medición de la variabilidad de las determinaciones. La tabla 6 muestra que los valores calculados para el CV,

en todos los casos, se encuentran por debajo del límite establecido para este parámetro en la norma cubana.<sup>(22)</sup>

**Tabla 6** - Resultados obtenidos del análisis de precisión intermedia

Compuesto	Cmedias		
	µg/g	SR	CV
Acenaftileno	5,90 ± 0,24	0,51	8,6%
Acenafteno	3,25 ± 0,42	0,14	4,4%
Fluoreno	1,52 ± 0,19	0,12	7,6%
Fenantreno	4,78 ± 0,22	0,51	10,6%
Antraceno	2,18 ± 0,11	0,53	7,0%
Fluoranteno	8,34 ± 0,40	0,90	10,8%
Benzo(a) Antraceno	6,05 ± 0,23	0,53	8,7%
Criseno	2,52 ± 0,10	0,22	8,9%
Benzo(b) Fluoranteno	4,22 ± 0,15	0,33	7,8%
Benzo(a) Pireno	8,11 ± 0,20	0,47	5,7%
Indeno(1,2,3-cd) Pireno	1,31 ± 0,07	0,11	8,3%

En base a los resultados anterior se concluye que el método es preciso bajo las condiciones establecidas por la norma cubana TS 368: 2010.<sup>(22)</sup>

### Límites de detección y cuantificación

La tabla 7 muestra los límites de detección y cuantificación calculados para cada uno de los compuestos, expresados en µg/g.

**Tabla 7** - Límites de detección y cuantificación

<b>Compuesto</b>	<b>Punto 1</b>	<b>LD</b>	<b>LC</b>
	<b>µg/g</b>	<b>(µg/10g)</b>	<b>(µg/10g)</b>
Naftaleno	0,11	0,007	0,024
Acenaftileno	0,09	0,007	0,024
Acenafteno	0,13	0,012	0,041
Fluoreno	0,18	0,008	0,027
Fenantreno	0,13	0,006	0,020
Antraceno	0,12	0,006	0,019
Fluoranteno	0,11	0,006	0,019
Pireno	0,12	0,010	0,034
Benzo(a) Antraceno	0,12	0,009	0,031
Criseno	0,09	0,007	0,025
Benzo(b) Fluoranteno	0,12	0,006	0,019
Benzo(k) Fluoranteno	0,09	0,006	0,020
Benzo(a) Pireno	0,09	0,010	0,033
Indeno(1,2,3-cd) Pireno	0,14	0,009	0,031
Benzo(g,h,i) Perileno	0,11	0,005	0,016

Estos límites son similares, sobre todo para el Naftaleno, Fluoreno y Pireno a los encontrados por Peña y colaboradores, cuando utilizaron la extracción con Soxhlet para el estudio de la contaminación por HAPs en sedimentos.<sup>(24)</sup>

Los límites de cuantificación encontrados respaldan la utilidad del método para el estudio de la contaminación en sedimentos, aun cuando los HAPs se encuentren a bajas concentraciones. Estos límites son inferiores a los niveles máximos permisibles (TEL) y al nivel de exposición permisible (PEL) de contaminantes en sedimentos marinos y dulceacuícolas.<sup>(25)</sup> El TEL y el PEL establecen la concentración de contaminantes sobre la cual aparecen con frecuencia efectos biológicos adversos.



## Estudio de la contaminación por Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en muestras reales de sedimentos

Una vez verificado el método, se procedió a su aplicación en el análisis de muestras reales de sedimentos, tomadas en el embalse Hanabanilla, Villa Clara y en la bahía de Cienfuegos, para determinar la posible contaminación por HAPs.

### Embalse Hanabanilla

Se estudiaron 15 HAPs considerados como prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA, *por sus siglas en inglés*) en muestras tomadas en un core de sedimentos. En la fracción superior del core (los tres primeros segmentos de 2 cm) que se corresponde con los sedimentos superficiales, fue posible cuantificar Antraceno, Fenantreno y Criseno según se muestra en la tabla 8. También se logró determinar el contenido como índice de HAPs totales que fue de 1,110 µg/g.

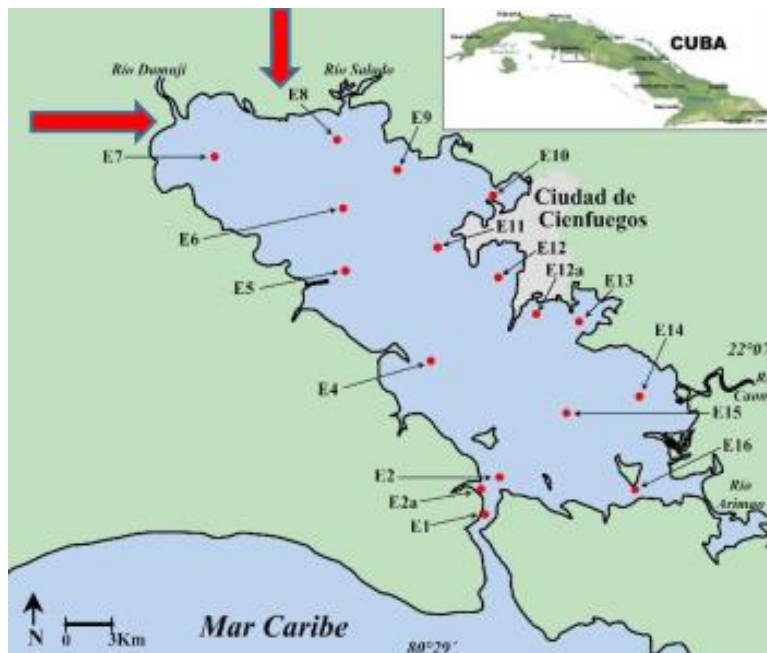
**Tabla 8** - Concentración de HAPs en sedimentos superficiales del Embalse Hanabanilla

Compuesto	Conc.(µg/g)	UExp
Antraceno	0,640	± 0,094
Fenantreno	0,330	± 0,028
Criseno	0,156	± 0,016

Es conocido el hecho de que las diferentes fuentes de contaminación generan una distribución característica de los HAPs, lo cual permite determinar el posible origen de la misma. Entre las relaciones diagnósticas más estudiadas para la contaminación por HAPs está la del fenantreno/antraceno.<sup>(1)</sup> Cuando dicha relación es menor que 10, como en el presente caso (0,516), se considera que la contaminación fue originada por la acumulación de productos procedentes de procesos de combustión incompleta de materia orgánica, lo que indica que la contaminación encontrada en los sedimentos del embalse Hanabanilla tiene un origen pirogénico.

## Bahía de Cienfuegos

Se tomaron muestras de sedimentos con el objetivo de estudiar el contenido de HAPs en las desembocaduras de los ríos Salado y Damují hacia la bahía de Cienfuegos. Estos se encuentran ubicados en el lóbulo norte de la bahía o zona industrial 2, como se observa en la figura 3. Las muestras se corresponden con el período seco del año 2014. Los sitios de muestreo están ubicados en las estaciones definidas para evaluar los aportes de acuatorios hacia la bahía, según lo establecido en el programa nacional de monitoreo a bahías. La localización de las estaciones de muestreo está relacionada con los impactos probables desde fuentes de contaminación al ecosistema primario, ya sea ríos, vertimientos directos o indirectos desde fuentes en tierra y las mismas coinciden con las estaciones del muestreo hidrológico, biológico y de sedimentos de la bahía.



**Fig. 3** - Red de monitoreo de la bahía de Cienfuegos, Cuba. Fuente: <sup>(16)</sup>

En el sedimento correspondiente a la estación del Río Salado fue posible determinar seis de los HAPs en estudio (tabla 10), a concentraciones similares a las encontradas por Tolosa y colaboradores en 2009 <sup>(16)</sup> en cuanto a los niveles de Fluoreno, Antraceno y Pireno. En el caso del

Fenantreno y el Antraceno, las concentraciones actuales fueron inferiores a las descritas en aquel estudio.

Para el caso de la estación ubicada en la desembocadura del Río Damují, los resultados difieren de los obtenidos en ese estudio previo, encontrándose ahora concentraciones más bajas de los HAPs presentes (tabla 9). La diferencia pudiera estar asociada, entre otras causas, a una atenuación o disminución de la fuente emisora de estos compuestos.

Es importante señalar que en las desembocaduras de ambos ríos, las concentraciones de todos los HAPs cuantificados supera el valor TEL <sup>(25)</sup> y que en ambas estaciones de monitoreo, se cuantificaron niveles de HAPs superiores al umbral PEL para Fluoreno, Antraceno y Pireno, lo cual tiene un impacto negativo directo sobre la salud de los organismos de la zona béntica.

**Tabla 9** - Resultados de los HAPs cuantificados y sus incertidumbres expandidas, reportados desde las estaciones de muestreo E7 y E8

Sítio de muestreo	Compuesto	Conc. (µg/g)	UExp
Río Salado	Naftaleno	0,31	± 0,027
	Fluoreno	0,25	± 0,074
	Antraceno	0,54	± 0,016
	Fenantreno	0,15	± 0,041
	Pireno	0,83	± 0,23
	Indeno(1.2.3-cd) Pireno	0,79	± 0,073
Río Damují	Fenantreno	1,36	± 0,06
	Indeno(1.2.3-cd) Pireno	0,44	± 0,093
	Benzo(g.h.i) Perileno	0,13	± 0,037
	Pireno	1,27	± 0,357

## Conclusiones

La adecuación y verificación interna del método US EPA 8100 permitió disponer de un procedimiento basado en la extracción asistida por ultrasonidos y determinación por CG, para la determinación fiable en muestras de sedimentos de 15 HAPs reconocidos como contaminantes

prioritarios. El método verificado resultó ser preciso, exacto y lineal en los intervalos de concentración estudiados para cada compuesto. Los límites de detección y cuantificación encontrados son similares a los obtenidos a nivel internacional para métodos equivalentes, empleados en la evaluación de estos contaminantes en muestras de sedimentos. La aplicación del método a muestras reales permitió demostrar la contaminación por HAPs en los sedimentos del embalse Hanabanilla y en las desembocaduras de los ríos Salado y Damují en la bahía de Cienfuegos.

## **Agradecimientos**

Los autores agradecen en primer lugar, por su contribución a la realización de esta investigación, al proyecto internacional “Soluciones a problemas específicos del manejo integrado de cuencas y áreas costeras en Cuba, a través de técnicas isotópicas y nucleares (TIN): Acidificación del Mar, Ciclo y Secuestro de CO<sub>2</sub>, Florecimiento de Algas Tóxicas, Especies Invasivas, Contaminación ambiental, Erosión-Sedimentación-Transporte de Nutrientes y Contaminantes, Eutrofización y Calidad de embalses de aguas, (MICATIN)”. Así como al colectivo de técnicos y especialistas, del Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC), por sus válidas contribuciones.

## **Referencias bibliográficas**

1. BOLAÑOS-VEGA, L.; BAEZ-CASTELO, R.; ARIAS-VERDES, J. A.; ESPINOSA-SUAREZ, R. “Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en mejillón verde (*Perna viridis*) de la Bahía de Cienfuegos”, *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras*. 2012, **29**(2), 49-53. ISSN: 0138-8452.
2. DABESTANI, R.; IVANOV, I. “A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons”. *Photochemistry and Photobiology*. 2013, **70**(4), 10-34. ISSN: 1751-1097.

3. AEKYUN, K.; CORT, A.; KENNEDY, I.; THOMAS, M. "Environmental aging of polycyclic aromatic hydrocarbons on soot and its effect on source identification". *Chemosphere*. 2011, **76**(8), 1075-1081. ISSN: 0045-6535.
4. TSYMBALYUK, K.; DENG, Y.; BERLINSKY, N.; ANTONOVICH, P. "Determination of 16 priority polycyclic aromatic hydrocarbons in bottom sediments of the Danube estuarine coast by GC/MS". *Geo-Eco-Marina*. 2011, **17**(46), 1-12. ISSN: 1224-6808.
5. FENG-JANG, Y. "Sedimentary record of polycyclic aromatic hydrocarbons and DDTs in Dianchi Lake, an urban lake in Southwest China". *Environmental Science Pollution Research*. 2013, **20**, 5471-5480. ISSN: 0944-1344.
6. STEPHEN DE MORA, T.; SCOTT, F.; JEAN, V.; ROBERTO, C.; CHANTAL, C. "Distribution of petroleum hydrocarbons, organochlorinated contaminants in marine biota, and coastal sediments from the Rompe Sea Area during 2005". *Marine Pollution Bulletin*. 2013, **60**, 31-42. ISSN: 0025-326X.
7. INES, Z. and others. "Aliphatic and Aromatic Biomarkers for Petroleum Hydrocarbon Investigation in Marine Sediment". *Journal of Petroleum Science Research (JPSR)*. 2013, **2**(4), 145-155. ISSN: 2168-5533.
8. DÍAZ-ASENCIO, M. y otros. "<sup>210</sup>Pb and <sup>137</sup>Cs as tracers of recent sedimentary processes in two water reservoirs in Cuba". *Journal of Environmental Radioactivity*. 2017, **177**, 290-304. ISSN: 0265-931X.
9. MARVIN, H.; ALLAN, L.; MCCARRY, E. "A comparison of ultrasonic extraction and soxhlet extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from sediments and air particulate material". *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2002, **49**(4), 221-230. ISSN: 0306-7319.
10. HAWTHORNE, B. and others. "Static subcritical water extraction with simultaneous solid-phase extraction for determining polycyclic aromatic hydrocarbons on environment solids". *Journal of Chromatography*. 2004, **886**(1-2), 237-244. ISSN: 0021-9673.

11. LÓPEZ, G.; P.GÓMEZ, M.; DUASO, H. "Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs): Toxicidad, exposición de la población y alimentos implicados". *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 2016, **10**(1), 1-15. ISSN: 1988-2688.
12. LÓPEZ, V. "Sample preparation for environmental analysis. Critical Reviews". *Analytical Chemistry*. 2001, **29**(3), 195-230. ISSN: 0003-2700.
13. SORIANO-SANZ, J.A. "Evaluación y seguimiento del contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en mejillón silvestre de la costa de Galicia y Cantábrico, antes y después del vertido del b/t Prestige". Tesis para optar por el grado académico de Doctor en Ciencias, Universidad da Coruña, Galicia, España, 2009. Disponible en URL: <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/5670>.
14. US EPA. "Polynuclear aromatic hydrocarbons, Method 8100". Washington, Virginia, USA, 1990.
15. RIBOT, O.; MIGUEL, Y.; DÍAZ-ASENCIO, M. "Niveles de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) acumulados en sedimentos del embalse Hanabanilla, Villa Clara, Cuba". *Revista Infociencia*. 2018, **22**(1), 1-13. ISSN: 1029-5186.
16. TOLOSA, I.; MESA, M.; ALONSO, C. "Inputs and sources of hydrocarbons in sediments from Cienfuegos bay, Cuba". *Marine Pollution Bulletin*. 2009, **58**(11), 1624-1634. ISSN: 0025-326X.
17. ANTIZAR-LADISLAO, B. "Polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, phthalates and organotins in northern Atlantic Spain's coastal marine sediments", *Journal of Environmental Monitoring*. 2009, **11**(1), 85-91. ISSN: 1464-0325.
18. IAEA. Reference Material IAEA-417 Organochlorine and petroleum hydrocarbons in a sediment sample. 2012. In: AGENCY, I. A. E. (ed.). Viena, Austria: Analytical Quality Control Services.
19. US EPA. "Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, Method 610". Washington, Virginia, USA, 1984.
20. US EPA. "Ultrasonic Extraction Hydrocarbons, Method 3550C". Washington, Virginia, USA, 2000.

21. US EPA. Gel-permeation cleanup. Scope and application. Method 3630A. Washington, Virginia, USA, 1994.
22. ONN. Guía para la validación de métodos de ensayos químicos para alimentos. TS 368: 2010 NORMA CUBANA. Habana, Cuba, 2010.
23. MORILLAS P.P. y otros. 13 de diciembre de 2017. "Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados"- (1ª ed. 2016). ISBN 978-91-87461-59-0. Disponible en [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)".
24. PEÑA, A.; MORALES, J.; LABASTIDA, C.; CAPELLA, S. "Extracción en fase sólida como una alternativa para el procedimiento de limpieza en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por cromatografía de gases: aplicación a organismos marinos", *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 2013, **19**(1), 13-23. ISSN 0188-4999.
25. BUCHMAN, M. F. "Screening Quick References Tables". United States National Ocean Service. Office of Response and Restoration. United States, National Oceanic and Atmospheric Administration. NOAA OR & R. Report. 2008, **08**(1), 1-34.

### **Conflicto de interés**

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses en el manuscrito presentado.

### **Contribución de los autores**

M.Sc. Orlando Viera Ribot. Realizó el trabajo de evaluación experimental de las muestras, el análisis y discusión de los resultados y preparó la versión inicial del manuscrito.

Dr.C. Sergio Morales Fernández. Asesoró en el diseño del estudio, participó en el análisis y discusión de los resultados obtenidos y en el proceso de corrección del manuscrito.