

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



* 5 3 0 9 5 5 6 5 1 0 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**DETERMINACIÓN DE PAHs EN MUESTRAS
AMBIENTALES MEDIANTE FLUORIMETRÍA Y HPLC**

MEMORIA QUE PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR PRESENTA

D. MOHAMED NOUR KAYALI

Madrid, 1994



Ciudad Universitaria
28040 Madrid
Teléf. 394 43 31

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA

SARA RUBIO BARROSO, PROFESORA TITULAR DE ESTE DEPARTAMENTO CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado "Determinación de PAHs en muestras ambientales mediante Fluorimetría y HPLC" ha sido realizado en este Departamento por D. MOHAMED NOUR KAYALI bajo mi dirección constituyendo la Tesis Doctoral de su autor.

Madrid, 24 de enero de 1994

إهداء
إلى أمي وأبي

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Dra. Sara Rubio Barroso, y con la beca concedida por el Instituto Hispano Árabe de Cultura, Sección de Intercambio Cultural del Ministerio de Asuntos Exteriores.

A la directora de esta tesis expreso mis más sinceros agradecimientos por su intensa dedicación, sus inestimables enseñanzas, gran paciencia y especialmente por su amistad.

Quiero agradecer al profesor Dr. Luis M^a Polo Díez, director de este Departamento, su acogida en el mismo, así como su gran ayuda, estímulo constante y los medios puestos a mi disposición que han hecho posible la realización de la presente Memoria.

También quiero expresar mis agradecimientos a todos los compañeros del Departamento por la ayuda y amistad prestada durante las muchas horas que compartimos en el laboratorio.

Agradezco, así mismo, al Dr. Francisco Javier Méndez González su apoyo, y las medidas y muestras de aire proporcionadas.

Muchas gracias a D. Joaquín Sarabia López por las muestras de humo de tabaco.

Igualmente doy las gracias al personal del Canal de Isabel II por las muestras de agua.

Por último, agradezco de todo corazón el apoyo y sacrificio que mi familia ha hecho desinteresadamente por mí.

INDICE

<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	1
<u>1.1. GENERALIDADES SOBRE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (PAHs)</u>	3
1.1.1. Características generales	3
1.1.2. Formación y fuentes de emisión	5
1.1.3. Distribución	17
1.1.4. Propiedades físicas y químicas	22
1.1.4.1. Solubilidad en agua, adsorción y volatilidad	22
1.1.4.2. Fotodegradación	24
1.1.5. Actividad cancerígena de los PAHs	26
1.1.5.1. Efectos sobre los seres vivos	34
1.1.5.2. Efectos sobre el hombre	36
<u>1.2. TOMA DE MUESTRA. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO (AIRE, HUMO DE TABACO Y AGUA)</u>	39
1.2.1. Toma de muestra	39
1.2.1.1. Consideraciones generales	39
1.2.1.2. Puntos de muestreo	40
1.2.1.3. Equipo necesario para la toma de muestra	43
1.2.2. Preparación de la muestra	52
1.2.2.1. Extracción	52
1.2.2.2. Purificación o clean-up	59
<u>1.3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS EN LA DETERMINACIÓN DE PAHs</u>	69
1.3.1. Técnicas cromatográficas	69
1.3.1.1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	69
a) Detección Fluorimétrica	69
b) Detección Fotométrica	74
1.3.1.2. Cromatografía de Gases (GC)	75
1.3.1.3. Cromatografía de Capa Fina (TLC)	78
1.3.1.4. Otras cromatografías	79

II

1.3.2. Técnicas luminiscentes	81
1.3.2.1. Espectrofluorimetría	81
1.3.2.2. Espectrofosforimetría	83
1.3.3. Otras técnicas	84
<u>1.4. GENERALIDADES SOBRE TENSIOACTIVOS Y MICELAS</u>	86
1.4.1. Definición y clasificación de los tensioactivos	86
1.4.2. Formación y estructura de las micelas	88
1.4.3. Propiedades físicas de las soluciones micelares	92
1.4.4. Aplicaciones analíticas de las soluciones micelares	96
1.4.4.1. Luminiscencia en medio micelar	97
1.4.4.2. Cromatografía líquida micelar (CLM)	99
<u>1.5. OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN Y JUSTIFICACIÓN DE ESTE TRABAJO</u>	108
<u>2. PARTE EXPERIMENTAL</u>	111
<u>2.1. INSTRUMENTACIÓN</u>	113
2.1.1. Equipos fluorimétricos	113
2.1.2. Cromatógrafo de líquidos	113
2.1.3. Muestreadores	115
2.1.4. Sistemas de extracción	115
2.1.5. Sistemas de concentración	116
2.1.6. Material auxiliar	116
<u>2.2. REACTIVOS</u>	117
2.2.1. Patrones de PAHs	117
2.2.2. Tensioactivos	117
2.2.3. Disolventes	117
2.2.4. Otros productos químicos	118

<u>2.3. MUESTRAS</u>	118
2.3.1. Aire	118
2.3.2. Humo de tabaco	118
2.3.3. Agua potable	119
<u>2.4. PROCEDIMIENTOS</u>	119
2.4.1. Estudio fluorimétrico de PAHs	119
2.4.1.1. Preparación de disoluciones patrones de PAHs y de tensioactivos	119
2.4.1.2. Registro de los espectros de fluorescencia	120
2.4.1.3. Influencia del tiempo y de la temperatura	121
2.4.1.4. Calibrados	121
2.4.1.5. Selectividad	122
2.4.1.6. Determinación fluorimétrica de PAHs en aire urbano	122
2.4.1.6.1. Toma de muestra, extracción y purificación	122
2.4.1.6.2. Evaluación y expresión de los resultados	122
2.4.2. Estudio de PAHs por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	123
2.4.2.1. Preparación de disoluciones patrones de PAHs	123
2.4.2.2. Preparación de la fase móvil:	124
a) Solución micelar de SDS	124
b) Hidro-orgánica	125
2.4.2.3. Puesta a punto del instrumento	125
2.4.2.4. Procedimiento experimental	126
2.4.2.4.1. Cromatografía líquida micelar (CLM)	127
a) Régimen isocrático	127
b) Régimen de gradiente	127
2.4.2.4.2. Cromatografía líquida de fase móvil hidro-orgánica	128
a) Columna Green PAH	129
b) Columna Ultraspher	129
2.4.2.5. Evaluación de los cromatogramas	129
2.4.3. Determinación de PAHs por HPLC en aire, humo de tabaco y agua	130
2.4.3.1. Aire	130
2.4.3.1.1. Toma de muestra, extracción y purificación	130
2.4.3.1.2. Procedimiento experimental	132
2.4.3.2. Humo de tabaco	134
2.4.3.2.1. Toma de muestra, extracción y purificación	134
2.4.3.2.2. Procedimiento experimental	135

IV

2.4.3.3. Agua	137
2.4.3.3.1. Toma de muestra, extracción y purificación	137
2.4.3.3.2. Procedimiento experimental	139
2.4.3.4. Evaluación y expresión de los resultados	141

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES 143

3.1. ESTUDIO FLUORIMÉTRICO DE LOS PAHs EN SOLUCIONES MICELARES DE TENSIOACTIVOS IÓNICOS 145

3.1.1. Espectros de fluorescencia de los PAHs en soluciones individuales de tensioactivos iónicos: SPS, SDS y CTAB	145
3.1.2. Factores de sensibilización en estos medios	152
3.1.3. Influencia del tiempo en la estabilidad de las disoluciones analíticas	154
3.1.4. Optimización de la temperatura de medida	155
3.1.5. Características analíticas en los medios micelares de SDS y CTAB	158
3.1.5.1. Calibrados	158
3.1.5.2. Precisión	161
3.1.5.3. Límites de detección y determinación	163
3.1.5.4. Selectividad	166
3.1.5.4.1. Determinación de pireno, B(a)p y B(a)a en solución micelar de SDS	167
3.1.5.4.2. Determinación de pireno, B(a)p y B(ghi)p en solución micelar de CTAB	171
3.1.6. Aplicación de los métodos propuestos a la determinación fluorimétrica de PAHs en aire urbano	175

3.2. ESTUDIO DE PAHs POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN, HPLC, CON DETECCIÓN FLUORIMÉTRICA 180

3.2.1. Separación de PAHs por cromatografía líquida micelar, CLM, en régimen isocrático	180
3.2.1.1. Efecto de la naturaleza de la fase estacionaria	181
3.2.1.1.1. Columna C18 Nucleosil	182

3.2.1.1.2.	Columna C1 Ultremex. Influencia de la concentración de SDS	186
3.2.1.1.3.	Columna C4 Hypersil. Efecto de las variables cromatográficas	191
	A) Composición de la fase móvil	192
	B) Temperatura	197
3.2.2.	Separación de PAHs por cromatografía líquida micelar, CLM, en gradiente	204
3.2.2.1.	Columna C4 Hypersil y fase móvil SDS/agua	204
3.2.2.2.	Columna C18 Nucleosil y fase móvil acetonitrilo/SDS	206
3.2.2.2.1.	Estudios preliminares	206
3.2.2.2.2.	Optimización de las variables cromatográficas	210
	A) Composición de la fase móvil	210
	B) Efecto de la concentración de SDS y caudal sobre el área de los picos cromatográficos	220
	C) Condiciones óptimas	222
3.2.2.2.3.	Características analíticas	222
3.2.3.	Separación de PAHs por HPLC con fase móvil hidro-orgánica	237
3.2.3.1.	Columna Hypersil Green PAH	237
3.2.3.1.1.	Optimización de las variables cromatográficas	237
3.2.3.1.2.	Características analíticas	245
3.2.3.2.	Columna Ultraspher	255
3.2.3.2.1.	Optimización de las variables cromatográficas	255
3.2.3.2.2.	Características analíticas	257
3.2.4.	Aplicaciones de los métodos cromatográficos propuestos a la determinación de PAHs en aire, humo de tabaco y agua	259
3.2.4.1.	Aire	259
3.2.4.1.1.	Determinación de PAHs por CLM con fase móvil Acetonitrilo/SDS	259
3.2.4.1.2.	Determinación de PAHs por HPLC utilizando la columna específica Green PAH y acetonitrilo/agua como fase móvil	262
3.2.4.2.	Humo de tabaco	271
3.2.4.2.1.	Preparación de la muestra: Optimización de variables experimentales	271
3.2.4.2.2.	Determinación de B(a)p por HPLC utilizando fase móvil acetonitrilo/agua	274
3.2.4.3.	Agua	282
3.2.4.3.1.	Preparación de la muestra: Optimización de variables experimentales	282
3.2.4.3.1.1.	Elección del eluyente	282
3.2.4.3.1.2.	Efecto del volumen de eluyente	285

VI

3.2.4.3.1.3. Efecto del volumen de muestra de agua	290
3.2.4.3.2. Comparación del método propuesto con el recomendado por la EPA 525	296
3.2.4.3.3. Determinación de PAHs por HPLC en agua potable	301
3.2.4.3.3.1. Agua del grifo	301
3.2.4.3.3.2. Agua bruta de embalse	302

<u>4. CONCLUSIONES</u>	309
------------------------	-----

<u>5. BIBLIOGRAFÍA</u>	315
------------------------	-----

1. INTRODUCCIÓN

إهداء
إلى أمي وأبي

1.1. GENERALIDADES SOBRE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (PAHs).

1.1.1. Características generales.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son compuestos homólogos del benceno en los que dos o más anillos se han unido bajo diferentes configuraciones y forman parte de un conjunto de compuestos denominado "materia orgánica policíclica" (POM).

Esta materia orgánica policíclica está constituida fundamentalmente por hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos aromáticos policíclicos con nitrógeno, oxígeno y azufre, como heteroátomos, así como nitroderivados de los PAHs, productos de reacciones fotoquímicas en la atmósfera.

El gran interés de los PAHs y muchos de los compuestos que constituyen el "POM" se debe a que algunos de ellos se ha demostrado que son agentes cancerígenos en animales de experimentación e incluso pueden en caso de encontrarse en concentraciones suficientes ser supuestamente inductores de algunos tipos de cáncer en el hombre.

Su presencia en la atmósfera es en forma de mezclas complejas, integradas por cientos de estos compuestos con diferentes intervalos de concentración. La distribución de los PAHs es diferente según se trate de productos procedentes del petróleo o deban su origen a un proceso de pirólisis.

En el caso de los compuestos procedentes del petróleo,

una de las posibles formas isoméricas predomina sobre el resto de ellas, así, el benzo(a)pireno destaca sobre el benzo(e)pireno y el fenantreno es alrededor de 50 veces más frecuente que su isómero el antraceno.

Si se consideran estos mismos PAHs cuando proceden de los gases de combustión de los motores de gasolina, diesel y otras combustiones, se encuentra que la relación benzo(e)pireno/benzo(a)pireno es 1:1, mientras que para fenantreno/antraceno esta relación es 4:1.

En cuanto al grado de alquilación de los PAHs, los hidrocarburos procedentes de combustiones se caracterizan por tener un grado de alquilación menor que los procedentes del petróleo que presentan un elevado número de sustituyentes.

En este proceso de alquilación relacionado estrechamente con la temperatura se observa que a temperaturas por ejemplo de 2000^o C, el fenantreno aparece sin ningún tipo de sustituyente; a 800^o C se presenta un sustituyente en muy baja proporción; a 400^o C son posibles derivados que tienen de uno a cuatro sustituyentes, aunque continúa siendo mayor la proporción del compuesto no sustituido y por último, entre 100 - 150^o C se pueden presentar derivados con hasta seis sustituyentes, entre los que predominan los di- y trialquilderivados frente al no sustituido (1).

Por tanto, los hidrocarburos aromáticos policíclicos que aparecen más frecuentemente en el medio ambiente son compuestos sin cadenas laterales; su distribución está siempre asociada con varios tipos de aerosoles y regulada por el transporte de los mismos, dependiendo de diversos

factores como son, las corrientes de aire, precipitaciones, condiciones meteorológicas, etc.

1.1.2. Formación y fuentes de emisión.

Formación

Los compuestos aromáticos policíclicos presentan elevados puntos de fusión y ebullición y son en general extremadamente insolubles.

Generalmente los PAHs se encuentran en la atmósfera asociados con las partículas finas (< 2.5 micras) que se forman en la combustión incompleta o pirólisis de los combustibles fósiles, y por procesos de carbonización en la formación del petróleo y del carbón.

La formación de los PAHs en la descomposición térmica de materiales orgánicos está basada en dos mecanismos fundamentales: combustión incompleta o pirólisis y pirosíntesis.

A altas temperaturas, los compuestos orgánicos son parcialmente craqueados o fragmentados en moléculas menores e inestables (pirólisis). Estos fragmentos en su mayoría radicales, se recombinan formándose moléculas mayores estables como son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (pirosíntesis) (2).

Generalmente en estos mecanismos intervienen compuestos como estireno, fenilacetileno o butilbenceno,

fenilbutadieno, etc. Estas reacciones han sido estudiadas por Badget y col. (3), y su mecanismo de formación se indica a continuación Figura 1.

La temperatura es un factor crítico en la formación de un determinado PAH. Badget y col., utilizando butilbenceno como intermediario en la producción de benzo(a)pireno, observaron que podía producirse

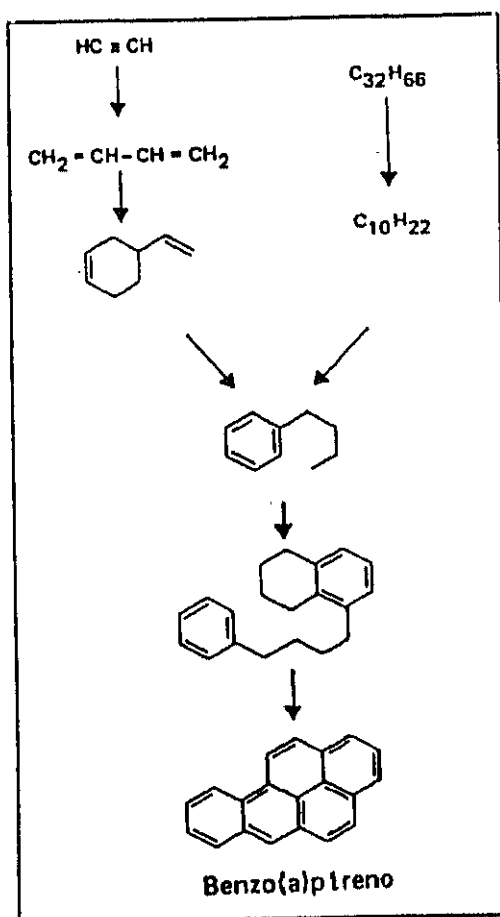


FIGURA 1: Síntesis de Benzo(a)pireno según Badget.

benzo(a)pireno o benzo(b)fluoranteno, dependiendo de la temperatura, por consiguiente un control estricto de la temperatura puede reducir la formación de un determinado compuesto.

Boobel (4) encontró que en una atmósfera con alto porcentaje de aire se producía benzo(a)pireno aunque en menor proporción que en atmósferas pobres en oxígeno.

En atmósferas inertes de N_2 y a $700^{\circ}C$, un gramo de glucosa, tabaco seco y parafina producen 886, 752 y 66,6 ng de benzo(a)pireno respectivamente.

En similares condiciones, un gramo de tabaco produce 44 ng de benzo(a)pireno a $400^{\circ}C$, mientras que ese mismo gramo de tabaco produce 183,5 ng de benzo(a)pireno a $1000^{\circ}C$ (5).

Fuentes de emisión

Los compuestos aromáticos policíclicos pueden tener su origen tanto en fuentes naturales como antropogénicas.

Fuentes naturales

Las fuentes naturales de los hidrocarburos aromáticos policíclicos están exclusivamente delimitadas a algunos tipos de biosíntesis, degradaciones a largo plazo y combustiones naturales.

En la bibliografía se describen algunos tipos de biosíntesis en algas y bacterias marinas, plantas superiores,... (6). Aunque existen discrepancias en cuanto a la veracidad de estas síntesis (7 y 8).

Los incendios de bosques y praderas quizás sean una de las mayores aportaciones de PAHs por combustiones naturales, detectándose PAHs en sedimentos de zonas en las que ha habido incendios forestales. Existen datos de emisiones estimadas entre 12-14 Tm/año producidas únicamente por los volcanes.

La degradación del material biológico es probablemente el método natural de formación de los PAHs ya que se han encontrado ciertos PAHs en los sedimentos y fósiles procedentes de materiales biológicos.

El naftaleno y otros hidrocarburos aromáticos y compuestos organosulfurados pueden haberse producido por reacciones del azufre elemental con terpenoides y esteroides.

El reteno (1 metil-7-isopropilfenantreno), por ejemplo, se ha detectado en suelos en los que existen pinares además de producirse también en la combustión de maderas resinosas, piceas o abetos. Este compuesto se emplea como trazador molecular de combustiones (9).

Compuestos con cuatro y cinco anillos se han encontrado en sedimentos, lignito y petróleo.

El perileno se ha encontrado en sedimentos en concentraciones significantes y puede ser posible su formación a través de la reducción de pigmentos de tipo

formación a través de la reducción de pigmentos de tipo quinónico (10 y 11).

Fuentes antropogénicas

Las fuentes antropogénicas son las de mayor contribución de los compuestos de este tipo con mayor riesgo para la salud del hombre.

Como fuentes de emisión antropogénicas más características e investigadas se pueden citar:

- Combustión del carbón, fuels, gas, madera, etc.
- Plantas industriales y producción de coke.
- Emisiones de automóviles.
- Combustión de basuras, residuos agrícolas y de bosques.

Las emisiones producidas por los vehículos a motor son la mayor fuente de emisión de PAHs a la atmósfera, representando un 36% del total anual. La producción de aluminio al igual que los incendios forestales aportan un 17% . Alcanzan un 12% las emisiones de las calefacciones, un 14% la producción de coke, un 4% las centrales térmicas y un 3% la incineración.

La incineración de aceites lubricantes, que por corresponder a la fase final de los destilados del petróleo, tiene un alto contenido en PAHs, eleva considerablemente la tasa de estos compuestos y en particular de benzo(a)pireno.

Durante la combustión incompleta o pirólisis de la

materia orgánica se forman algunos centenares de PAHs, así por ejemplo hasta el año 1967, en el alquitrán de carbones se describían 106 PAHs, en el humo de los cigarrillos cerca de 280, hasta 146 PAHs en los gases de escape de los automóviles y en los gases del fuel-oil 108 (sin contar los de dos anillos), habiendo sido estos caracterizados por espectrofotometría U.V. y espectrometría de masas (5).

Por el momento no ha sido posible totalizar los PAHs emitidos por las fuentes de emisión más frecuentes. Existen no obstante, valoraciones parciales de algunas de estas fuentes.

El factor de riesgo de los PAHs en estas emisiones se mide en relación al benzo(a)pireno, de carácter cancerígeno, emitido; se considera que un kilogramo de fuel-oil durante la combustión suministra entre 0.0001 mg y 100 mg de benzo(a)pireno.

En la tabla 1 viene indicado el porcentaje individual en relación con el benzo(a)pireno de grupos de estas emisiones en la emisión total de los mismos efectuada en EE.UU.

El intervalo de concentraciones de un determinado PAH varía por tanto considerablemente, dependiendo de las fuentes de emisión. Para el caso del benzo(a)pireno, estas concentraciones varían ampliamente como puede observarse en la tabla 2 (12).

TABLA 1

Porcentaje de benzo(a)pireno para diferentes tipos de emisiones.

Foco de emisión	Tm/año	%
- Combustión de basuras, residuos agrícolas y forestales	563	44
- Combustión de carbón, fuel-oil, gas y madera	475	38
- Plantas industriales y producción de coke	200	16
- Emisiones de automóviles	22	2
TOTAL	1260	100

TABLA 2

Concentraciones de benzo(a)pireno en materia particulada medida en diferentes fuentes.

FUENTES DE EMISIÓN	CONCENTRACIÓN (ppm)
Vehículos a motor (túneles)	66-500
Combustión del carbón:	
Calefacciones urbanas (antracitas)	10-20
Calefacciones urbanas (otros carbones)	240-600
Centrales térmicas	0.0007
Centrales térmicas (Fuel-oil)	0.005
Calefacciones urbanas (madera)	
Chimeneas	3-141
Horno	213-870
Planta de coke	1400-5800
Suelo	0.1-2.3

La concentración del benzo(a)pireno en la atmósfera es en invierno de cinco a diez veces más alta que en verano y en las zonas urbanas de cinco a veinte veces mayor que en zonas rurales.

El carbón es otro productor importante de energía. El empleo de éste como combustible de las calefacciones se incrementó en las décadas de los años 50 - 70 especialmente en Estados Unidos y en los países de la Comunidad Económica Europea.

Las emisiones de benzo(a)pireno debidas a la combustión del carbón son mayores que para otros combustibles. Estas emisiones son mayores para las calderas residenciales que queman carbón que para grandes calderas (centrales térmicas) que trabajan a altas temperaturas con exceso de aire.

Existen grandes diferencias en cuanto a tipos de carbón empleados e incluso al tipo de horno en el que se produce la combustión.

En un estudio realizado por Brokhans y col. (5), tabla 3 se muestran las cantidades medidas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en los gases procedentes de la combustión para seis tipos de carbones: antracitas, lignito, coke,...

Las fuentes de emisión de los hidrocarburos aromáticos policíclicos pueden en principio ser conocidas a través de las diferentes proporciones de los PAHs emitidos. Los primeros intentos para identificar las fuentes de contaminación fueron realizados por Sawicki y más recientemente por Grimmer y cols. (13).

TABLA 3
Cocentración de PAHs en ng/m³ en la combustión de diferentes tipos de carbón.

Carbones	Antracita bola X 10 ³	Lignito briquetas X 10 ³	Antracita	Coke	Antracita tipo anzit	Antracita t.extrazit
Fluoranteno	78.5	89.7	8.8	-	3904.0	8.3
Pireno	86.8	15.4	24.8	1.7	129.7	4.4
Benzo(a)antraceno	195.0	20.9	89.3	8.7	1819.0	4.5
Criseno	163.3	15.5	109.5	18.5	3490.0	17.7
Benzo(b)fluoranteno	205.1	14.5	163.5	71.2	1871.0	15.8
Benzo(k)fluoranteno	86.9	3.2	27.0	8.7	25.8	0.6
Benzo(e)pireno	197.8	34.3	182.0	1152.0	877.2	32.1
Benzo(a)pireno	84.9	5.0	11.8	10.2	2.2	0.5
Perileno	138.5	12.5	22.9	17.4	140.0	-
Dibenzo(ah)antraceno	22.6	10.2	12.5	-	53.8	-
Benzo(ghi)perileno	95.9	20.2	27.0	120.8	73.0	5.1
Coroneno	40.5	8.3	7.8	5.8	11.1	1.8
Total PAHs	1618	227.4	754.8	1412	12.2X10³	110.8

En estos estudios observaron que las proporciones entre algunos PAHs eran diferentes dependiendo del foco emisor. El benzo(e)pireno es un hidrocarburo que se emplea como hidrocarburo tipo y se utiliza para obtener un índice de referencia de los demás PAHs, dividiendo la concentración de éstos por la concentración de benzo(e)pireno. La elección entre otros de éste compuesto obedece a varios tipos de consideraciones, fundamentalmente debido a su estabilidad ya que reacciona en la atmósfera muy lentamente y porque se encuentra exclusivamente en materia particulada (14).

También se han ensayado algunos otros compuestos con este mismo fin, es decir poder utilizarlos como índices de referencia, tal es el caso de los benzofluorantenos, pero tienen el inconveniente de ser menos abundantes y más difíciles de ser resueltos cromatográficamente, ya que se trata de tres isómeros de los cuales el benzo(k)fluoranteno y el benzo(j)fluoranteno son difícilmente separables por cromatografía capilar, en tanto que mediante esta técnica se separan fácilmente benzo(a)pireno de benzo(e)pireno. En el estudio realizado por Grimmer encuentra grandes diferencias en el cociente PAHs/benzo(e)pireno. Un ejemplo de este tipo de relaciones está recogido en la tabla 4.

Pueden observarse diferencias importantes como las obtenidas para el ciclopentano(cd)pireno que es francamente diferente para las emisiones producidas en un túnel a causa del tráfico de vehículos, de las producidas por la combustión del carbón o del petróleo. También son significativas las diferencias obtenidas para el benzo(ghi)perileno y coroneno ya que estos hidrocarburos están íntimamente asociados con las emisiones producidas por los vehículos a motor.

Otros autores han tratado de determinar diferentes índices relativos de disminución o de degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos basados en diferencias de sus concentraciones diurnas en áreas urbanas medidas en cortos períodos de tiempo (una hora), donde se pueden estudiar parámetros relacionados con la concentración como son temperatura, radiación solar, altura de la zona de mezclado de contaminantes, velocidad del viento y reacciones de fotodegradación en presencia de oxidantes (15).

TABLA 4

Relación PAHs / Benzo(e)pireno.

Relación PAHs/ Benzo(e)pireno	Tráfico en túneles	Area residencial: Calderas		
		Carbón	Fueloil	Coke
Antraceno	2.2	0.4	0.6	0.3
Benzo(c)fenantreno	2.2	0.4	0.6	0.3
Benzo(a)antraceno	1.2	1.4	1.0	1.2
Ciclopenta(c,d)pireno	5.3	0.02	0.4	0.4
Criseno	1.8	2.5	2.6	1.8
Benzo(b)fluoranteno	1.2	1.4	1.7	1.3
Benzo(k)fluoranteno	1.0	1.2	1.5	1.0
Benzo(j)fluoranteno	Difícil de resolver cromatográficamente			
Benzo(e)pireno	1.0	1.0	1.0	1.0
Benzo(a)pireno	1.2	0.6	0.9	1.0
Perileno	0.2	0.06	0.25	0.3
Benzo(ghi)perileno	1.8	0.7	1.0	0.6
Indeno(1,2,3,-cd)pireno	0.8	0.6	1.0	0.6
Coroneno	0.9	0.2	0.3	0.06
Antrantreno	0.5	0.07	0.3	0.07
Benzo(b)nafto(2,1-d) tiofeno	0.5	0.6	0.7	0.35

Sicre y cols. (16) han extraído de la bibliografía datos para confeccionar una serie de índices de fuentes establecidas y bien estudiadas y a través de los cuales es posible acceder con facilidad a las fuentes de los distintos PAHs (tabla 5).

TABLA 5

Índices de correlación de PAHs con sus fuentes emisoras.

	Fenantreno/ Fen+Antraceno	Fluoranteno/ Fl+Pireno	B(a)a/ B(a)a+cris+ Trifenileno	B(e)p/ B(e)p+B(a)p	2Ind(1,2,3,cd)p Ind(1,2,3,cd)+ B(g,h,i)per
Petróleo	≈ 0.98	0.18±0.08	0.16±0.12	0.87±0.11	-
Aceite motor usado	≈ 0.78	0.36±0.08	≈ 0.5	0.84±0.10	0.25±0.05
Emisiones gasolina	0.77±0.12	0.43±0.08	-	0.53±0.05	0.18±0.03
Partículas: combs.madera	-	-	0.40±0.03	0.38±0.08	0.82±0.07
Partículas: combs.carbón	-	-	0.48±0.09	0.30±0.08	0.57±0.12
Combustión lignito	-	0.58±0.03	0.40±0.02	0.51±0.07	0.47±0.09
Calefacciones urbanas:carbón	≈ 0.88	≈ 0.52	≈ 0.39	≈ 0.48	≈ 0.55
Hornos coke	0.67±0.11	0.51±0.08	0.43±0.05	≈ 0.23	-
Combustión antracita	-	0.58±0.02	0.43±0.04	0.43±0.08	0.52±0.05

En muchos casos estos índices serán sólo indicativos, ya que en emisiones urbanas en las que intervengan simultáneamente distintas fuentes, estos índices se desplazarán dependiendo de la intensidad de un determinado foco de emisión.

1.1.3. Distribución.

Como se ha indicado anteriormente, las altas temperaturas alcanzadas en los procesos de combustión son las precursoras de PAHs en la mayoría de las atmósferas urbanas. Hasta principios de siglo, existía un balance natural de producción-degradación de PAHs, con lo cual la concentración de estos era baja (17). Con el crecimiento industrial el balance natural se ha visto perturbado aumentando la producción y acumulación de PAHs en el medio ambiente, aire, agua, sedimentos, alimentos, tabaco ...

Aire

La distribución de los PAHs en la atmósfera depende de un gran número de variables. Los PAHs van asociados con distintos tipos de aerosoles, bien de origen natural o consecuencia de las acciones humanas (18 - 20). Las fuentes naturales de aerosoles incluyen el polvo arrastrado por el viento, la brisa del mar, los fuegos forestales, las emanaciones volcánicas, los meteoritos y determinada vegetación.

En dos estudios de identificación en los cuales se combinó la cromatografía de gases y la espectrometría de masas se obtuvieron entre otros los siguientes resultados (21 y 22):

1. El nivel de benzo(a)pireno en atmósferas no urbanas, cuyo aire se supone no contaminado, oscila entre 0.1 y

0.5 ng/m³. Mientras que la concentración que resulta en aire contaminado es de 74 ng/m³.

2. Había una considerable variación en la concentración de PAHs en función del lugar de toma la de muestra, el cual es representativo de las distintas fuentes de PAHs.
3. Muestras tomadas en el mismo lugar, en cortos periodos de tiempo podían experimentar variación en la concentración de PAHs en función de las distintas condiciones meteorológicas.
4. El aire en zonas urbanas estaba más contaminado durante el día que durante la noche, debido a que el tráfico y las emisiones industriales son mayores durante el día.
5. La contaminación era más pronunciada en otoño y en invierno que en primavera y verano, debido entre otras causas a las calefacciones y a las variaciones meteorológicas propias de la estación.

En general, los PAHS que más frecuentes aparecen en la atmósfera son fluoranteno, pireno y benzo(a)pireno, entre los más abundantes se encuentran el fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, benzofluorantenos, indeno y benzo(ghi)perileno (23).

Por otra parte, el benzo(ghi)perileno es indicador de emisiones de vehículos y el benzo(a)pireno indicador de referencia por su poder cancerígeno e indicador de fuentes de contaminaciones domésticas e industriales (23-27).

Agua

La distribución de los PAHs en los distintos tipos de agua depende de la fuente: productos de desecho de los petroleros, aceites de áreas de ejercicio y almacenamiento, agua de lluvia que al llegar al suelo arrastra los PAHs del aire y los contenidos en el suelo, y efluyentes de las plantas industriales.

Las aguas de suelo que permanecen sin contaminar por las actividades humanas tienen una concentración de PAHs cancerígenos en el intervalo de 0.001-0.10 µg/litro, mientras que la concentración de PAHs cancerígenos en el agua de un lago no contaminado es 10 veces superior (28 y 29).

Las distintas solubilidades de los PAHs en agua son determinantes en el contenido de estos compuestos. Así, los PAHs de mayor peso molecular y menor polaridad son los más insolubles en agua. Y por otro lado, hay que tener en cuenta que una gran proporción de los PAHs que contienen las aguas contaminadas son adsorbidos por las partículas sólidas suspendidas en éstas.

Sedimentos

La acumulación de PAHs en las partículas de sedimentos se origina mediante dos procesos. Los PAHs más insolubles en agua tienen tendencia a precipitar en las partículas de sedimentos o a ser adsorbidos en partículas sólidas suspendidas que son eventualmente incorporadas en los

sedimentos.

En unos estudios realizados en un río de Nueva Inglaterra (30) el más soluble de los PAHs, el naftaleno, fué encontrado sólo en el agua. Aquellos PAHs de solubilidad intermedia, como antracenos y fenantrenos, fueron encontrados en agua y sedimentos. Mientras que aquellos de baja solubilidad, como los de peso molecular en torno a 228, fueron encontrados sólo en los sedimentos.

Recientemente se han descubierto mezclas extremadamente complejas de PAHs en sedimentos (30-32).

La estabilidad de los PAHs en los sedimentos es mayor que en el aire o en el agua. La vida media de los PAHs sometidos a la radiación solar puede ser de horas a días (18, 28 y 33-35). Mientras que los PAHs incorporados a los sedimentos tienen una degradación más lenta.

También hay que tener en cuenta que la bioacumulación o biodegradación de los PAHs por ciertos organismos puede cambiar la distribución de los PAHs en los sedimentos con el tiempo (36-38).

Por otra parte se ha observado que las mezclas de PAHs en la corteza terrestre varían de tener uno o dos componentes a ser mezclas multicomponentes. Las mezclas simples pueden encontrarse en asbestos, ciertos minerales, arcillas recientes y lodos de carbonatos (39-44). Mezclas más complejas pueden encontrarse en rocas sedimentarias antiguas y fósiles (45-47).

Alimentos

Las fuentes de contaminación de alimentos por los PAHs son muchas y variadas. Humos, suelos contaminados, contaminación del aire y del agua, aditivos, procesos a los que se someten los alimentos, cocinado y fuentes endógenas, todos ellos contribuyen a la concentración de los PAHs en diferentes alimentos.

La contaminación de frutas y vegetales foliáceos con PAHs ocurre por depósito a partir de la atmósfera, suelo y agua contaminados en las zonas industriales.

Algunas investigaciones muestran que en los procesos de elaboración, tales como fritura, asado, tostado y ahumado de carnes y pescados, producen altos niveles de benzo(a)pireno (48 y 49).

Tabaco

Componentes comunes de la hoja del tabaco son importantes precursores de los PAHs (50 y 51).

La distribución de los PAHs en el humo del tabaco depende de varios factores, como son: el tipo de tabaco, la humedad, el tipo de papel que envuelve al cigarrillo, la permeabilidad de éste, el tipo de filtro y la temperatura en el proceso de combustión. Existen estudios sobre los efectos de dichas variables, así como determinaciones de los PAHs en el humo del tabaco (52-54). En recientes estudios se han llegado a identificar hasta

150 PAHs diferentes (55-57).

1.1.4. Propiedades físicas y químicas.

Las propiedades físicas y químicas de los PAHs varían en general de un modo regular con el peso molecular. La capacidad para sufrir reacciones redox aumenta con el peso molecular, mientras que la solubilidad en agua y la presión de vapor disminuyen exponencialmente al aumentar el peso molecular.

1.1.4.1. Solubilidad en agua, adsorción y volatilidad

Dentro de las propiedades físicas de los PAHs se encuentran la solubilidad en agua, adsorción y volatilidad, de ellas aunque indirectamente se ha hablado anteriormente.

Solubilidad en agua

Tomando como base esta propiedad, los PAHs se dividen en dos grupos:

a.) Los de bajo peso molecular con tan sólo 2 ó 3 anillos aromáticos. Son relativamente solubles, volátiles y relativamente tóxicos para los organismos acuáticos.

b.) Los de elevado peso molecular que tienen de 4 a 7 anillos aromáticos. Son más insolubles, tóxicos y pueden

llegar a originar un proceso cancerígeno.

Adsorción

Puesto que los PAHs presentan baja solubilidad en agua e igualmente baja presión de vapor, son adsorbidos fácilmente.

Con respecto a esta propiedad y a la anterior, cabe señalar la adsorción sobre las partículas acuáticas. Si en un medio acuático existe una baja concentración de PAHs, lo que en verdad se está reflejando es una relación de partición desfavorable en la fase acuosa ya que en las partículas acuáticas el contenido de estos PAHs es varios órdenes de magnitud superior. Relacionado con este último aspecto se ha comprobado que en los sedimentos de río se recupera aproximadamente el 50% del benzo(a)pireno y de otros PAHs de elevados pesos moleculares.

Volatilidad

La volatilización de los PAHs disminuye al hacerlo también la presión de vapor.

Los PAHs con 4 ó más anillos tienen una volatilización insignificante, pero los de menor número de anillos sufren una evaporación sustancial. Este último hecho resulta de vital importancia para el transporte de estos PAHs.

1.1.4.2. Fotodegradación

Está ampliamente demostrado por la comunidad científica que los compuestos orgánicos polinucleares presentes en los aerosoles son susceptibles de sufrir transformaciones fotoquímicas en presencia de la luz solar (58).

Para corroborar estas afirmaciones se han desarrollado estudios de laboratorio en atmósferas artificiales partiendo de mezclas sintéticas de compuestos orgánicos o procedentes de partículas de hollín de combustiones de diferentes procedencias, gas-oils, madera, etc. Estas mezclas han sido sometidas a la acción de la radiación ultravioleta de lámparas de mercurio y xenón. El tipo de substrato tiene una gran influencia en la velocidad de degradación, ya que se ha comprobado que PAHS asociados con partículas cuyo contenido carbonoso es superior al 20% ofrecen una degradación media entre 125-263 horas, mientras que para PAHs depositados sobre alúmina o gel de sílice la velocidad de degradación oscila entre 0.4 y 156 horas (59-61).

La radiación solar en presencia de O_2 , O_3 y contaminantes como, NO_x , SO_2 , nitratos de peroxiacilo (PAN) y otros, pueden interaccionar con los PAHs por ejemplo para formar productos más polares como son nitro-PAH y oxi-PAH considerados mutágenos de alto potencial (62-64).

En experimentos desarrollados en el laboratorio se ha comprobado que algunos PAHs, así como algunos PAHs sustituidos, pueden ser transformados en nitroderivados en atmósferas artificiales por reacción con el NO_2 y el HNO_3

(65).

La transformación de PAHs en nitroderivados también tiene lugar por medio de radicales. El radical que interviene en estas reacciones es fundamentalmente el NO_3 , originado en presencia de ozono (66).

Pitts, Zielinska y cols. (67-70), de la Universidad de California, han estudiado las reacciones de los PAHs con diferentes radicales nitrogenados, tanto en atmósferas artificiales como reales, y la caracterización de nuevos nitroderivados de los PAHs.

Por otra parte se ha comprobado que los PAHs pueden degradarse por ozonólisis. En estudios realizados con ozono se ha observado que la vida media del benzo(a)pireno y del antraceno es relativamente corta, para el benzo(e)pireno y pireno intermedia, para los benzofluorantenos más larga, es decir, de 12 minutos para el antraceno y de 70 minutos para los benzofluorantenos. El benzo(a)pireno sometido a este tratamiento produce las 1,6; 6,12 y 3,6 quinonas derivadas del benzo(a)pireno. Estos compuestos obtenidos en laboratorio también se han detectado en la atmósfera de Alemania, Escandinavia y Toronto (71 y 72).

La temperatura es un factor importante en la degradación de PAHs asociados a las partículas. Kamens y cols (73) observaron este tipo de degradación encontrando que a 20°C existe una disminución apreciable de PAHs cuya desaparición fue estimada entre 30 y 60 minutos; por el contrario, a 0°C la estabilidad puede extenderse a varias horas e incluso días.

Durante el período invernal en que la atmósfera suele

encontrarse a temperaturas bajas, y la inclinación solar es mayor hace posible que exista mayor permanencia de los PAHs en la atmósfera.

En climas moderados como es nuestro caso, donde los inviernos son suaves, los PAHs pueden sufrir diferentes tipos de degradaciones dependiendo de la temperatura y de la radiación solar.

En consecuencia, la fotodegradación de los PAHs adsorbidos, depende entre otros factores de la concentración de oxígeno y ozono (el tiempo de vida media disminuye al aumentar las concentraciones de oxígeno y ozono), de la temperatura (aumenta exponencialmente con esta) y de la existencia de la radiación solar (74).

1.1.5. Actividad cancerígena de los PAHs

Los primeros estudios sobre la composición química de los productos de la combustión se llevaron a cabo hace ya varias décadas, desde entonces muchos PAHs han sido aislados e identificadas sus estructuras. Subsiguientes pruebas biológicas de estos compuestos aislados han llevado a la evidencia de su poder cancerígeno.

La actividad cancerígena de cada uno de estos compuestos depende de su estructura molecular, así por ejemplo, existen cinco isómeros estructurales para la serie de cuatro anillos con peso molecular 228 figura 2. De estos cinco compuestos el benzo(a)antraceno (I), criseno (II), benzo(c)fenantreno (III), presentan actividad cancerígena mientras que el trifenileno (IV) y el naftaceno (V) no la

poseen.

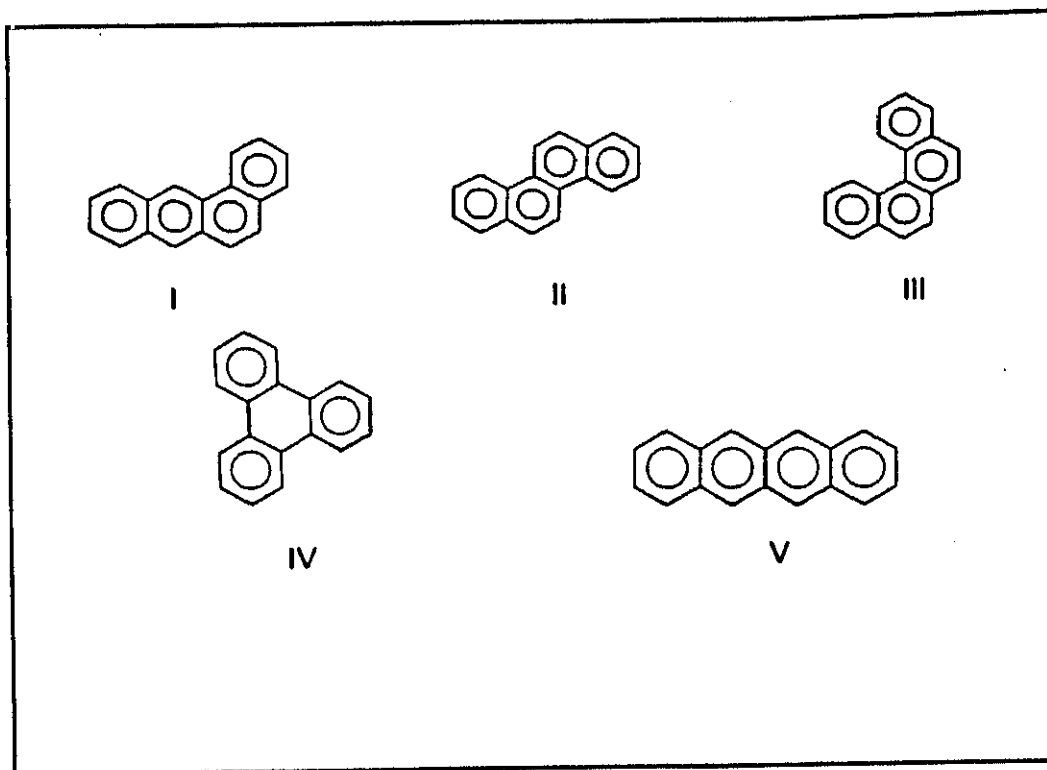


FIGURA 2: Isómeros estructurales para la serie de cuatro anillos con peso molecular 228

La localización de un grupo alquilo en la molécula de los PAHs puede jugar también un papel esencial en su actividad ya que tal sustitución puede alterar la distribución electrónica dentro de la molécula y pueden originar un efecto, activador o bien desactivador.

No se conoce realmente como se inicia el proceso canceroso una vez que los PAHs se encuentran en el

organismo. Las investigaciones se han dirigido hacia las interacciones que tienen lugar entre los constituyentes celulares y los PAHs. Estudios *in vivo* e *in vitro* han puesto de manifiesto que estos compuestos se unen al ADN, ARN y a las proteínas. Debido a la elevada densidad electrónica de los PAHs, existe la posibilidad de formación de enlaces covalentes entre estos compuestos y las biomoléculas. Para que estas uniones se lleven a cabo, es necesario que previamente tenga lugar una transformación, es decir en el caso concreto del benzo(a)pireno sea metabolizado a su homólogo 7,8 diol-9,10 epóxido.

Los microorganismos presentes en los suelos, aguas residuales, agua de mar, atmósfera, etc., son capaces de degradar los PAHs. Estas reacciones implican la introducción de dos grupos hidróxilos en los núcleos aromáticos a través de un hidrodíol (75). Los grupos hidróxilos pueden entrar en posición orto o para según sea la posterior escisión enzimática. Las bacterias producen un intermedio *cis*-dihidrodíol, mientras que los mamíferos producen el isómero *trans* por un óxido de areno intermedio, este último areno es el responsable de que los PAHs tengan propiedades mutagénicas y cancerígenas.

Según Dipple y col. la actividad metabólica se realiza mediante el citocromo P₄₅₀ y por una epóxido-hidrolasa. El esquema para el benzo(a)pireno es el siguiente (figura 3) (76):

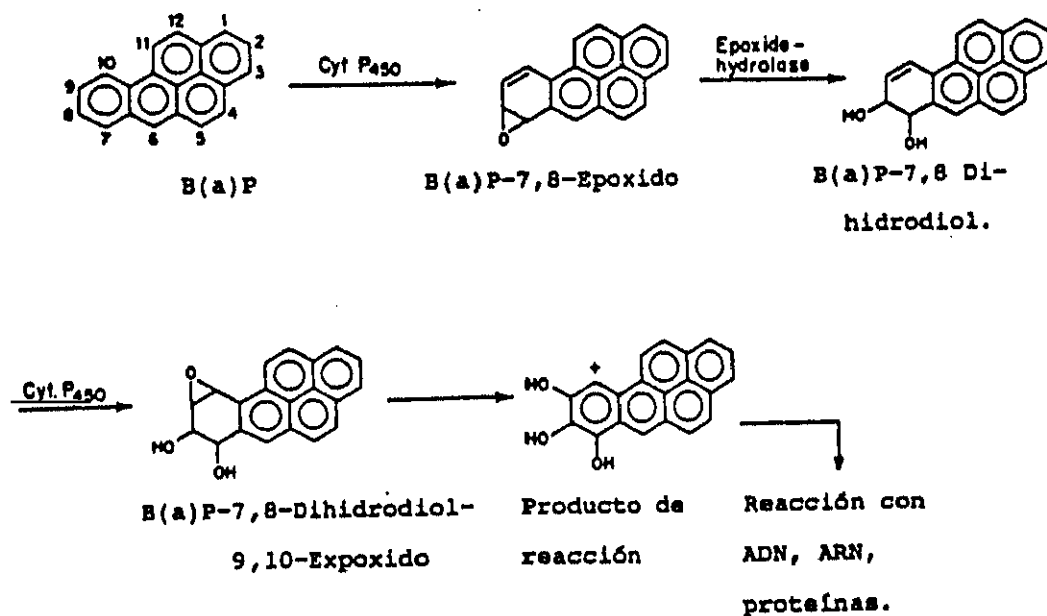


FIGURA 3: Actividad metabólica del benzo(a)pireno

El último producto en esta secuencia de reacciones es el que reacciona con el ADN, ARN y proteínas. Esta reacción con el ADN es la más importante en el desarrollo del proceso cancerígeno.

Los PAHs de bajo peso molecular son degradados completamente a CO_2 y H_2O . Por el contrario los PAHs de elevado peso molecular originan distintas formas fenólicas.

Los mamíferos poseen un sistema enzimático, denominado

por las siglas MFO (Mixed Function Oxygenase), que se encuentra en el hígado, este sistema enzimático es el encargado de metabolizar a varios compuestos orgánicos, incluyendo entre éstos a los PAHs. El MFO actúa como un sistema transportador de electrones en presencia de NADPH (Nicotinamida Adenín Dinucleotido Fosfato).

Según Ames, los PAHs no exhiben una mutagenicidad directa (son inactivos) y solamente presentan esta característica cuando son activados por vía enzimática (77).

Para detectar la mutagenicidad de tóxicos como los que se encuentran en la materia particulada orgánica, existen más de 100 tipos de bioensayos a corto plazo, utilizándose desde células de bacterias hasta células humanas.

Uno de los más empleados es el test de B.Ames, que emplea la bacteria *Salmonella typhimurium*, que constituye un ensayo rápido (aproximadamente tres días) y barato para detectar mutaciones.

Por medio de este método se han ensayado gran cantidad de compuestos químicos y se han catalogado sus actividades mutagénicas en el Environmental Mutagen Center (EMIC) (78).

Grimmer (79) ha estudiado la actividad biológica de los extractos procedentes de gases de escape de automóviles separándolos en tres fracciones: la primera constituida por alcanos fundamentalmente y libre de compuestos aromáticos, representa un porcentaje del 82.8% del total; la segunda fracción, integrada por compuestos aromáticos con menos de tres anillos, representa un 13%; y la tercera con compuestos aromáticos de tres anillos en adelante, sólo

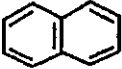
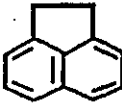

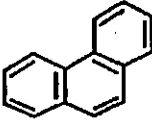
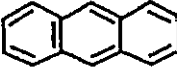
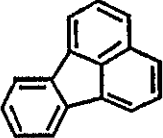
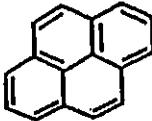
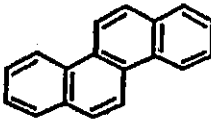
contiene el 3.5% del total del porcentaje. Se ha obtenido que la fracción aromática con mayor número de anillos condensados presenta una actividad mutágena del 60% siendo menor del 10% la fracción libre de compuestos aromáticos; la fracción correspondiente a compuestos con dos o tres anillos sólo tiene una actividad menor del 5%.

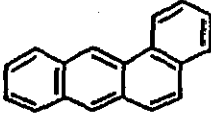
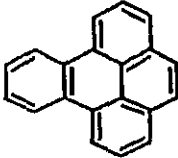
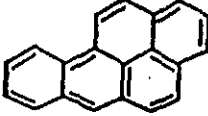
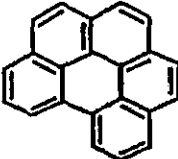
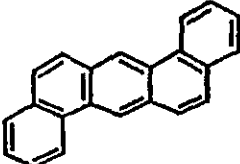
En extractos procedentes de los motores diesel la fracción de PAHs también debe su actividad biológica a derivados oxigenados, especialmente los nitroderivados, estimándose que estos presentan entre el 20 - 50% de la actividad mutagénica total de los extractos de diesel cuyo porcentaje de masa solo es del 0.01.

El poder cancerígeno de los PAHs ha sido observado principalmente en los compuestos tri, tetra, penta y hexacíclicos, entre los PAHs que tienen más de seis anillos, solo se ha encontrado poder cancerígeno en unos pocos. Los motivos de esta limitación en los PAHs de mayor número de anillos no están claros aunque se cree que su escasa solubilidad pueda ser una de las causas.

En la tabla 6 viene indicada la actividad carcinógena y la estructura correspondiente a los PAHs objeto de estudio en esta Memoria, los cuales son considerados por la EPA contaminantes prioritarios.

TABLA 8
Estructura y poder carcinógeno de los PAHs estudiados

<u>Nombre IUPAC del PAH</u>	<u>Estructura</u>	<u>Abreviatura</u>	<u>Poder cancerígeno</u>
Naftaleno.....		-	-
Acenafteno.....		-	-
Fluoreno.....		-	-
Fenantreno.....		-	-
Antraceno.....		-	-
Fluoranteno.....		-	-
Pireno.....		-	-
Criseno.....		-	+

<u>Nombre IUPAC del PAH</u>	<u>Estructura</u>	<u>Abreviatura</u>	<u>Poder cancerígeno</u>
Benzo(a)antraceno.....		B(a)a	+
Benzo(e)pireno.....		B(e)p	-
Benzo(a)pireno.....		B(a)p	+++
Benzo(ghi)perileno....		B(ghi)p	+
Dibenzo(ah)antraceno..		Db(ah)a	+++

- No cancerígeno

+ Cancerígeno

1.1.5.1. Efectos sobre los seres vivos

Una vez expuesta la toxicidad a nivel general, que presentan los PAHs, se procede a ver los distintos efectos tóxicos de estos compuestos sobre distintos organismos vivos.

Plantas acuáticas

La toxicidad de los PAHs en las plantas acuáticas es muy variable, depende de las especies, del tipo de PAHs, de la concentración y de las condiciones del medio ambiente. La exposición de las algas a los PAHs origina una pérdida rápida de clorofila y cambios en la composición mineral (la cantidad en manganeso y potasio disminuye). También puede originar una disminución de las proteínas y un aumento de los carbohidratos y lípidos.

En general todos estos cambios pueden influir provocando una mortandad elevada entre las plantas del medio acuático. (80).

Invertebrados

El efecto sobre los invertebrados es muy parecido al de las plantas acuáticas. Se han realizado estudios sobre los efectos que produce la intoxicación crónica de los invertebrados. Como datos de este estudio se desprende que los síntomas son: reducción del crecimiento, disminución

de la fecundidad, desórdenes en el comportamiento, aumento de leucocitos y aparición de divertículos en el estómago e intestino. (81).

Peces

La exposición prolongada a los PAHs produce en los peces una reducción en el crecimiento y en la fecundidad.

Incluso pueden producir alteraciones mayores como la aparición de tumores, lesiones renales, escoliosis, daños en las branquias y una disminución de hemoglobina y proteínas.

También se ha comprobado que las larvas son, en general, mucho más susceptibles a los PAHs que las especies adultas (82).

Mamíferos

Estudios realizados en animales de experimentación han demostrado que el efecto que ejercen los PAHs sobre los mamíferos es similar al que producen sobre el hombre ya que tanto las vías de penetración de los PAHs en el organismo como su metabolismo son semejantes (78).

1.1.5.2. Efectos sobre el hombre

Los PAHs y sus derivados sustituidos son muy solubles en los lípidos y normalmente estos compuestos se encuentran en el tejido adiposo e hígado.

La vía primaria para la eliminación de los PAHs cancerígenos es a través de los sistemas hepático y gastrointestinal. Por otro lado los PAHs que no son cancerígenos son eliminados en la orina.

El tiempo de vida media en las personas es muy variable y es función fundamentalmente de la naturaleza del hidrocarburo en cuestión. Intimamente relacionado con este último aspecto está el poder cancerígeno de cada compuesto, ya que guarda una proporción directa con su tiempo de vida media.

El riesgo de los PAHs en el hombre proviene por vía inhalación o por ingestión de alimentos. Puesto que la absorción de estos compuestos en la mucosa estomacal y tracto intestinal parece ser más bien baja, la aspiración de estos compuestos juega un papel decisivo de riesgo. Los PAHs llegan al tracto respiratorio en el hombre como aerosoles, siendo separados de las finísimas partículas y metabolizados. Según estudios realizados, una persona que vive en una atmósfera con un contenido de 10 mg/cm^3 de benzo(a)pireno, inhala alrededor de 3 mg. de benzo(a)pireno a lo largo de 60 años.

El riesgo se incrementa en personas fumadoras. En el apartado anterior se ha hablado de las diferentes fuentes de emisión de los PAHs entre los que se encontraba el humo

del tabaco. En estudios realizados se ha demostrado que el humo del tabaco puede contener del orden de 20 a 50 ng de benzo(a)pireno por cigarrillo (83).

Por otra parte la existencia de compuestos químicos que podrían inducir a enfermedades profesionales ya fueron observados por Percival Pott en 1776; observó que existía una correlación de la aparición de cáncer de escroto en los trabajadores dedicados a la limpieza de chimeneas. Consideró que podrían existir en el hollín de las chimeneas determinados compuestos químicos capaces de inducir este tipo de enfermedad, dándose además la circunstancia de que malas prácticas higiénicas propiciaban la permanencia de las partículas de hollín sobre la piel de los trabajadores.

Así mismo se han descrito numerosos estudios de enfermedades de piel en trabajadores potencialmente expuestos a estos compuestos en industrias relacionadas con el petróleo y el carbón.

Dado el extraordinario interés de los estudios de carcinogénesis de las emisiones diesel, se han desarrollado estudios epidemiológicos sobre trabajadores expuestos a la inhalación de humos de este tipo. Los grupos ocupacionales más estudiados han sido los conductores de transporte londinense, los trabajadores del ferrocarril de Estados Unidos y Canadá, y los conductores de taxis y camiones de Londres y otras ciudades.

Teniendo en cuenta los datos de las concentraciones de benzo(a)pireno, PAHs cancerígenos y total de PAHs, en el aire de la ciudad de los Angeles, se admite que la población humana puede estar expuesta a 0.5, 2.0 y 10.9 ng/m³ respectivamente, y teniendo en cuenta que la

cantidad de aire inhalado por el hombre a diario se estima entre 15 y 23 metros cúbicos, la ingesta diaria para este tipo de compuestos correspondería a 0.005 - 0.0115 $\mu\text{g}/\text{día}$ de benzo(a)pireno, 0.03 - 0.046 $\mu\text{g}/\text{día}$ para PAHs cancerígenos y 0.165 - 0.251 $\mu\text{g}/\text{día}$ para el total de los PAHs. Estos datos corresponden a las estimaciones de las medias anuales en la ciudad de Los Angeles (84).

1.2. TOMA DE MUESTRA. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO (AIRE, HUMO DE TABACO Y AGUA)

1.2.1. Toma de muestra

1.2.1.1. Consideraciones generales

La calidad de un análisis está altamente condicionada por las diferentes etapas a seguir en el muestreo y preparación de la muestra, de aquí que todo programa de investigación considere como primer objetivo, el desarrollo de la metodología para un muestreo real y efectivo que pueda conducir a un análisis adecuado y preciso. Muchos de los problemas de la toma de muestra revisten características peculiares según el aspecto particular del medio ambiente que se estudie, o bien de la naturaleza de la muestra que se pretende estudiar.

Otros factores a tener en cuenta son la heterogeneidad de la composición de la muestra y periodo de recogida de la misma. Debido a esto un programa de muestreo para estudios medio ambientales, aire, agua, debe tener en cuenta los ciclos de actividad con objeto de identificar variaciones periódicas y establecer diferencias entre valores máximos y valores medios.

Por último, y como consideración de suma importancia se puede indicar que la naturaleza química de los contaminantes a muestrear y las propiedades físico-químicas de los mismos son condicionantes básicos para hacer una correcta elección del método de muestreo.

1.2.1.2. Puntos de muestreo

Los puntos de muestreo tienen distintos parámetros dependiendo del tipo de muestra a tomar. Teniendo en cuenta el tipo de muestras que se analizan en el presente trabajo de investigación, a continuación se detallan algunos de los aspectos a considerar cuando se trata de muestras de aire, tabaco y agua.

Aire

Es importante definir el lugar más apropiado para el muestreo, así como la situación y número de puntos del mismo. Entra así mismo dentro de estos criterios la frecuencia y duración de la toma de muestra siendo ambos factores casi totalmente dependientes del objetivo que se persigue, de la naturaleza de los contaminantes y de los tipos de fuentes de emisión. No existe sin embargo ninguna normativa patrón de regulación de estos criterios ya que son función del objetivo específico que se pretende conseguir, aunque se han establecido algunas reglas generales de procedimiento en lo que se refiere a los parámetros meteorológicos: estabilidad atmosférica, velocidad y dirección del viento, precipitación, temperatura, humedad, radiación solar, ... (85-90 y 82-84).

La duración de la toma de muestra está establecida en períodos de 24 horas reduciéndose de 6 a 8 horas para períodos de alta contaminación. El caudal puede variar entre 18 y 90 m³ de aire/ hora, como consecuencia de los bajos niveles de concentración de PAHs existentes y a la

limitada sensibilidad analítica.

Se pueden fijar períodos continuos de muestreo, pero debido a su elevado coste y a las estrechas diferencias de niveles que se obtienen en similares épocas del año, la frecuencia se puede reducir a una muestra semanal que puede tomarse haciendo rotativo el día de la semana elegido de una semana a la siguiente.

El captador se situará a 2 metros como mínimo del suelo y alejado de edificaciones, (91 y 92), si las hubiera, el punto más alto de las mismas deberá formar un ángulo con el captador menor de 30° (93).

Cuando se quieran establecer redes de vigilancia en las que sea necesaria una mayor densidad de equipos habrá que establecer métodos estadísticos basados en modelos de difusión y datos meteorológicos de la zona en estudio (94-97). Así mismo se tendrá cuidado de no situar dos equipos muy próximos para evitar que el aire ya filtrado por el primero sea captado por el segundo (98).

Tabaco

Para la toma de muestra del tabaco existe una normativa patrón de regulación. Se recomienda realizar la toma de muestra normalmente en cada producción de tabaco con el fin de llevar a cabo un análisis de control y así poder ser apto para su venta en el mercado. Para ello, de una marca determinada, se recogen distintos cigarrillos a lo largo de la producción diaria. Por otra parte, dependiendo del tipo de componentes que se vayan a

determinar se elige el número de cigarrillos necesarios.

Una vez que la muestra se encuentra en el laboratorio, se lleva a un recinto provisto de una serie de compartimentos especiales y aireados, de manera que el tabaco mantenga el grado de humedad necesario; además el recinto debe disponer de un climatizador para el control de la temperatura que debe ser ésta de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (99).

Agua

El método establecido para la toma de muestra es común a todos los tipos de muestreo de agua, cualquiera que sea su procedencia, ya sea de manantiales, pozos, ríos, lagos, redes de distribución de agua, depósitos, ...

Dependiendo de la procedencia de la muestra, así como del tipo de análisis que se vaya a realizar, los puntos de muestreo se fijarán, bien sobre la superficie del agua o bien a diferentes niveles de profundidad.

Por otra parte, la frecuencia de muestreo también va a depender de la procedencia de la muestra, pudiendo variar desde varias tomas de muestra a lo largo del día hasta ser reducida a una toma de muestra por semana.

Se pueden definir tres tipos de muestras:

- Muestras simples; son aquellas tomadas en un tiempo y lugar determinado para su análisis individual.
- Muestras compuestas; son las obtenidas por mezcla

y homogeneización de muestras simples recogidas en el mismo punto y en diferentes tiempos.

- Muestras integradas; son las obtenidas por mezclas de muestras simples recogidas en puntos diferentes y simultáneamente (100).

1.2.1.3. Equipo necesario para la toma de muestra

Aire

Entre los sistemas de captación de partículas de aire se encuentran los equipos de captación por impactación y por filtración, siendo éste el más utilizado.

El sistema de captación por impactación o choque está basado en la interposición de una placa en el flujo de aire, siendo tanto mayor el impacto cuanto mayor sea el tamaño de la partícula. La eficacia del método es función directa del diámetro, y densidad de la partícula así como de la velocidad del flujo del aire. Actualmente se emplean impactadores con varias placas con el fin de conseguir una distribución de partículas por tamaños (101).

La mayor utilidad y eficacia analítica la presentan este tipo de captadores cuando se asocian con muestreadores por filtración de gran caudal.

El sistema de muestreo por filtración consiste en el paso de una corriente de aire a través de un filtro, produciéndose la captación de partículas según diferentes

mecanismos físicos tales como impactación, intercepción, atracción electrostática o sedimentación.

En este sistema de captación la eficacia es función del tamaño de partícula, del caudal y de las posibles reacciones que se puedan producir en la superficie del filtro.

Dependiendo del caudal que pasa a través del captador, los muestreadores pueden ser de bajo volumen, cuando el caudal es de $2 \text{ m}^3/24 \text{ h}$, volumen medio, entre $0.5 - 2 \text{ m}^3/\text{h}$, y alto volumen para caudales superiores a $20 \text{ m}^3/\text{h}$.

Este último es el más utilizado tanto en trabajos de rutina como en estudios de investigación química del aerosol. Se conoce bajo la denominación de muestreador de alto volumen y se considera como equipo de gran utilidad en el control ambiental. La EPA lo ha designado como sistema de captación de partículas en suspensión en el aire (102).

Captador de partículas convencional

El captador de partículas convencional es un equipo de alto volumen que no separa perfectamente las partículas finas de las gruesas. El punto de corte es superior a 15 nm . Consta de tres partes fundamentales: soporte o cabezal para el filtro, sistema de aspiración y sistema de control de caudal o corriente de aire.

El cabezal suele tener forma de tejadillo con el fin de proteger el filtro del viento y de la lluvia. En su base

se sitúa una rejilla metálica para evitar la ruptura del filtro por la aspiración durante la toma de muestra. El diseño del cabezal deberá ser capaz de proporcionar un régimen laminar y uniforme de caudal.

En la figura 4 se indica uno de los captadores de alto volumen más utilizados.

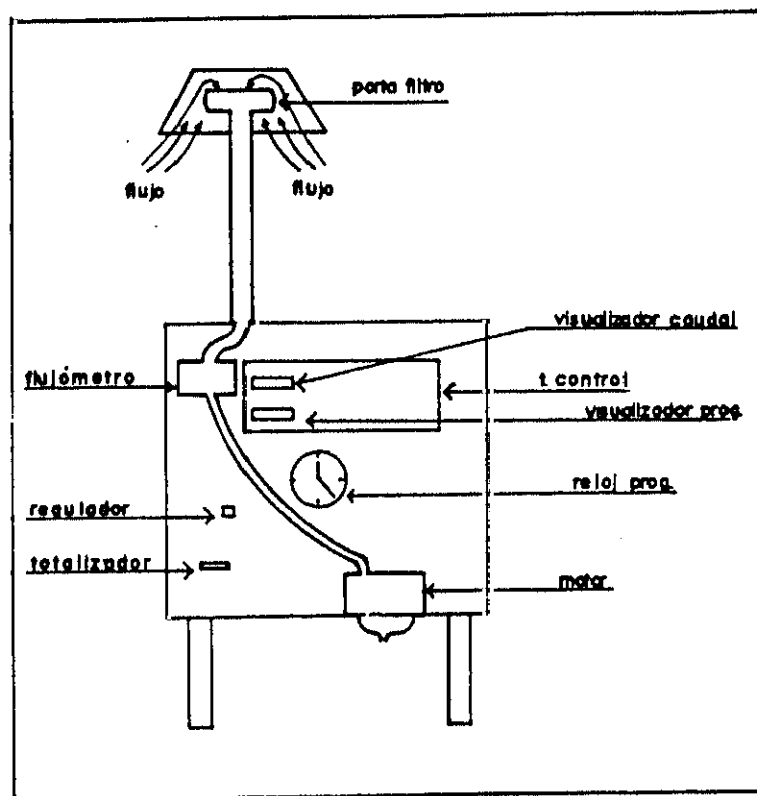


FIGURA 4: Captador de partículas MCV.

Los filtros representan el medio primordial de caracterizar la materia particulada en el aire, presentan en general una serie de ventajas respecto a otros medios de captación como es su facilidad de manejo, el poder admitir grandes volúmenes de aire, existir una gran variedad de tipos y tamaños e incluso se puede mantener el flujo lineal con sólo cambiar el filtro variando así el volumen de aire muestreado (103).

Se puede operar en diferentes condiciones de temperatura, humedad y cantidad de materia a filtrar, simplemente eligiendo el tipo de filtro más apropiado.

Los mecanismos mediante los cuales las partículas quedan atrapadas en estos medios filtrantes se basan fundamentalmente en fenómenos tales como: impactación, intercepción directa, difusión o en fuerzas tanto electrostáticas como gravitacionales (104).

En la bibliografía existen numerosos estudios experimentales realizados con gran variedad de filtros, entre los que se encuentran los de fibra de celulosa, de vidrio, de cuarzo, de fibras mezcladas y de membrana.

Humo de tabaco

Máquina fumadora

Debido al desarrollo tecnológico de los últimos años, existen actualmente máquinas fumadoras que poseen los requisitos necesarios y fundamentales para poder llevar a

cabo un análisis de control en el tabaco. Estas máquinas se caracterizan por tener una buena reproducibilidad en cuanto a los compuestos generados en la combustión de los cigarrillos y por otra parte, poseen una capacidad para fumar prácticamente igual a la de una persona fumadora.

El funcionamiento de estas máquinas fumadoras está basado en un mecanismo de aspiración análogo al que poseen los pulmones humanos, quedando atrapado el humo en sistemas filtrantes de iguales características a los utilizados en las muestras de aire.

Existen actualmente dos tipos de máquinas fumadoras que cumplen la Norma ISO 3308 (99). En la figura 5 se muestra una de ellas.

Consta de 8 canales alineados lo que le permite fumar 8 cigarrillos simultáneamente. De esta manera se consiguen 8 muestras, obtenidas en las mismas condiciones, lo que conlleva a un aumento en la reproducibilidad.

Por otra parte, teniendo en cuenta que la máquina fuma bajo unas condiciones controladas, aumenta notablemente la repetitividad en las muestras aunque éstas hayan sido tomadas en diferentes días.

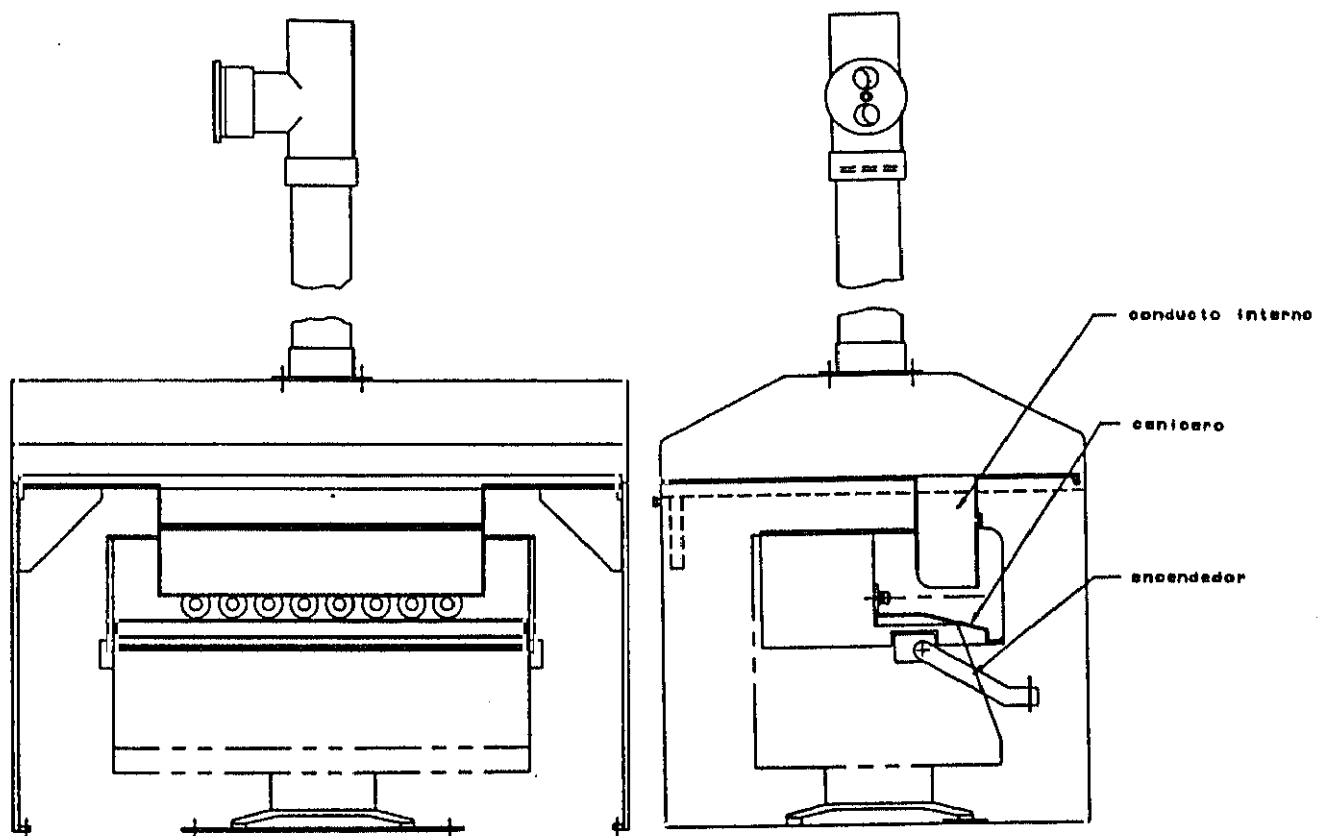


FIGURA 5: Máquina fumadora de 8 canales alineados

Agua

Los equipos o aparatos que se utilizan para la toma de muestra de agua dependen de la procedencia de la muestra, de las condiciones físicas del lugar del muestreo, así como del tipo de análisis y parámetros físicos a determinar. Estos equipos están establecidos y se enumeran a continuación:

- Directamente mediante la botella o recipiente que se vaya a enviar al laboratorio o que se utiliza para las determinaciones *in situ*.
- Equipos de toma de muestras representados en las figuras 6 y 7 o similares.
- Bombas peristálticas.
- Equipos automáticos.

El objetivo fundamental consiste en conseguir que la porción de agua tomada sea representativa y dado que la toma de muestras, de hecho, presenta una enorme variedad de situaciones diferentes, en todos aquellos casos en que sea posible se fijarán para cada uno de ellos las condiciones más apropiadas en función de las necesidades de los análisis de control que se vayan a realizar.

En fuentes, redes de distribución, pozos dotados de bomba de extracción y casos similares será necesario dejar fluir el agua durante el período de tiempo que se estime conveniente para conseguir que la muestra sea verdaderamente representativa.

En ríos, embalses, ..., será preciso considerar diversos factores, tales como profundidad, caudal de

corriente, distancia a la orilla,..., recomendándose en estos casos la obtención de muestras integradas y de no ser posible se tomará una muestra simple en el centro de la corriente o varias muestras simples en los lugares más apropiados de la masa de agua.

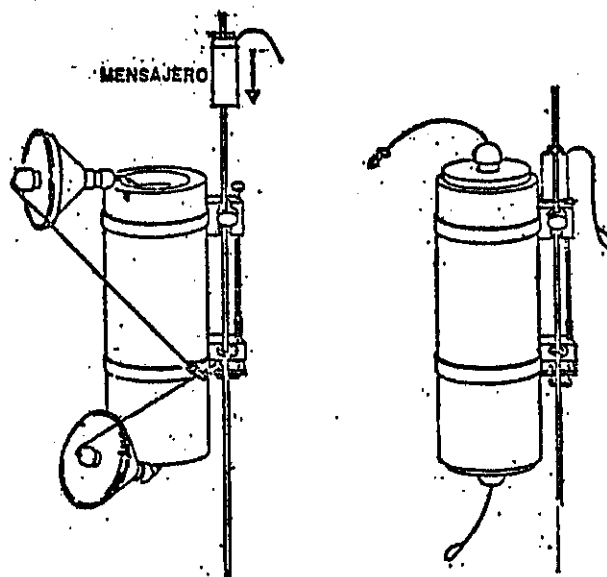
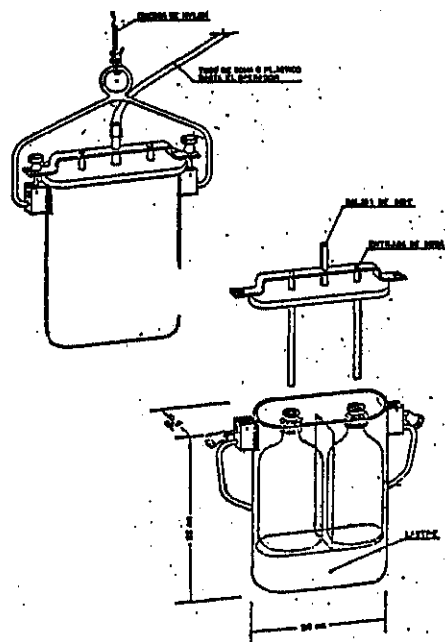
Por otra parte, siempre que sea posible, el recipiente debe enjuagarse con el agua objeto del muestreo.

El equipo especificado en la figura 6 se utiliza para toma de muestras en grifos de redes de distribución, canales de riego, fuentes, arroyos de poca profundidad, pozos dotados de bomba de extracción y casos similares.

En ríos, embalses, pozos sin bomba de extracción, grandes depósitos de almacenamiento y casos similares se utiliza el equipo especificado en la figura 7, siempre que la profundidad no exceda de 30 metros.

Si la profundidad es superior a 30 metros, se utilizan bombas peristálticas que llevan acoplado un tubo de una longitud determinada, dependiendo de la profundidad a que se encuentre el punto de muestreo.

Los equipos automáticos se utilizan en aquellos casos especiales donde no pueden establecerse normas fijas debido a la amplia gama de posibilidades de trabajo, tales como toma de porciones en función del tiempo, del caudal circulante, de las características de la muestra, almacenamiento en un único o múltiples recipientes, con refrigeración, con adición de reactivos,...



FIGURAS 6 y 7: Muestreadores de agua

1.2.2. Preparación de la muestra

1.2.2.1. Extracción

Todo proceso de muestreo requiere posteriormente, como paso obligado la recuperación de las sustancias muestreadas y la eliminación por tanto de aquellas otras que interfieren o simplemente no son necesarias por ser de naturaleza distinta a las que se ocupa la determinación objeto de estudio.

La elección del proceso de extracción depende en gran parte del tipo de muestra a analizar. Es sabido que cuando la matriz de la muestra es soluble en el disolvente utilizado no se presentan problemas importantes, pero cuando no ocurre así, puede suceder que la separación no sea completa. Por ejemplo, los PAHs pueden quedar adsorbidos sobre la superficie de determinadas partículas sin ser extraídos totalmente. La extracción de este tipo de contaminantes va a depender del equilibrio de adsorción-desorción que se establezca entre la matriz o residuo insoluble y el disolvente.

Agentes extractantes

Se han estudiado a lo largo de los últimos quince años un gran número de disolventes que pueden ser utilizados para el correcto aislamiento de los compuestos orgánicos de muestras de distinta complejidad; si, no para cada una

de las sustancias químicas presentes, sí, al menos para aquellas que por sus características químicas afines, puedan ser extraídas conjuntamente.

A fin de conseguir una extracción eficaz de los componentes que constituyen una muestra tan compleja como puede ser el aerosol atmosférico, se han realizado estudios basados en el empleo de diferentes disolventes en este campo, tratando de utilizar aquéllos que reúnan unas características tales, que puedan ser capaces de extraer cuantitativamente los compuestos orgánicos que interesan.

En orden de aplicación, quizá sea el benceno el agente extractante más utilizado en el estudio de partículas atmosféricas, partículas procedentes de motores diesel, cenizas procedentes de chimeneas, para solubilizar los compuestos poliaromáticos que contienen. Su utilización se ha reflejado en la bibliografía en numerosas publicaciones durante un amplio período de tiempo.

En los estudios de eficacia de extracción con este disolvente para el caso de los PAHs, se han obtenido resultados superiores al 95% (105 y 106).

Debido a su toxicidad, pues se ha demostrado que los vapores por inhalación pueden inducir a la leucemia (107), su empleo ha disminuido considerablemente.

Algunos hidrocarburos aromáticos de tipo tolueno y xileno han sido también utilizados como agentes extractantes, por considerarlos menos tóxicos que el benceno. Tanto el tolueno como el benceno han sido desplazados por otros disolventes como el ciclohexano (108-

110) por ser menos tóxico que éstos y porque además, al no presentar absorción en la región del ultravioleta, permite el uso de métodos de detección espectroscópicos.

El ciclohexano se ha empleado extensamente en la extracción de parafinas, PAHs y otros compuestos aromáticos de naturaleza neutra con similares recuperaciones que las proporcionadas por el benceno, aunque de menor eficacia cuando se trata de matrices complejas en las que los compuestos aromáticos se encuentran fuertemente adsorbidos.

El empleo del diclorometano se ha impuesto sobre otros disolventes debido a su bajo punto de ebullición, sin necesidad de someter las muestras a temperaturas elevadas que podían conducir a pérdidas por evaporación considerables. Es un disolvente capaz de extraer también compuestos semipolares y no polares sustituyendo por lo tanto eficazmente al benceno (111).

El metanol es un disolvente de gran poder de extracción y puede emplearse sólo o mezclado con otros disolventes menos polares. Su eficacia de extracción es del orden de 1.25 veces mayor que la del benceno (112) y de 1.61-1.69 más que la del ciclohexano (112 y 113). Puede extraer compuestos tales como sales y ésteres (114) e incluso sales inorgánicas. No obstante, el empleo del metanol lleva asociados complicados procesos de purificación posteriores.

Algunos autores han ensayado mezclas binarias con disolventes tales como: benceno-metanol (115), diclorometano-metanol (116) o ciclohexano-diclorometano (116) en un solo proceso con el fin de extraer la mayor parte de los componentes presentes en una muestra compleja

como puede ser el aerosol atmosférico.

Metodología de extracción

Existen varias técnicas de extracción para los compuestos orgánicos ambientales entre las que destacan:

- a) Sublimación a vacío
- b) Extracción mediante dispositivo soxhlet
- c) Extracción mediante baño de ultrasonidos
- d) Extracción mediante fluidos supercríticos

a) Sublimación a vacío

El equipo consiste en un dispositivo de vidrio de forma esférica por el que circula agua a una temperatura de 5 - 10°C y que posee una superficie de contacto de alrededor de 1600 mm². Este dispositivo se introduce en un tubo de vidrio en el que es posible realizar vacío, y en cuyo fondo se deposita la muestra. El conjunto se introduce en un horno a 300°C, reduciéndose simultáneamente la presión a 0.1 torr durante un tiempo variable (de 15 minutos hasta 96 horas), lo que provoca la sublimación de la muestra que se deposita sobre la superficie esférica fría (117).

El procedimiento de sublimación a vacío presenta la ventaja de no contaminar la muestra con la presencia de disolventes como agentes externos a ella. Necesita no obstante instrumentación de precisión y las recuperaciones

para compuestos aromáticos semipesados son bajas. Es un procedimiento no obstante útil para la extracción de un determinado tipo de PAHs.

Los procedimientos de extracción más utilizados según datos bibliográficos son los que se realizan mediante soxhlet y baño de ultrasonidos.

b) Extracción mediante dispositivo soxhlet

La técnica de extracción en soxhlet se basa en la solubilización de compuestos que se encuentran en una determinada matriz. La matriz se coloca en el interior de un extractor (percolador de vidrio) de funcionamiento continuo. El recipiente de vidrio que contiene la muestra está situado entre un matraz de destilación y un refrigerante de reflujo conectado al matraz a través de un sifón. El matraz contiene el disolvente que se evapora y pasa a través del sifón hasta el refrigerante de reflujo, donde se condensa y gotea sobre la muestra disolviendo las sustancias de la matriz. Esta solución se va acumulando en el recipiente de vidrio que contiene la muestra y tras haber alcanzado un determinado nivel se descarga automáticamente en el matraz inferior en el que por la constante evaporación de disolvente puro se van acumulando y concentrando las sustancias extraídas. Esta técnica ha tenido siempre una gran aceptación (118-121 y 23). Produce buenas recuperaciones en diferentes matrices ambientales, empleando distintos disolventes.

Hay que tener en cuenta que este procedimiento requiere al menos seis horas para que la extracción sea

cuantitativa y que durante este tiempo los componentes a extraer están sometidos a temperaturas elevadas, siendo tanto mayores cuanto mayor sea el punto de ebullición del disolvente empleado.

c) Extracción mediante baño de ultrasonidos

Esta técnica consiste en la aplicación de ondas de alta frecuencia, producidas por un generador y propagadas mecánicamente por un transductor al interior de un baño de agua en donde se encuentra introducida la muestra en un disolvente adecuado, dando lugar a un efecto de cavitación o formación de burbujas. El procedimiento presenta la ventaja de necesitar períodos de extracción relativamente cortos para proporcionar recuperaciones superiores al soxhlet cuando se trata de compuestos de bajo peso molecular (122-126).

Para compuestos de alto peso molecular y matrices en las que los compuestos se encuentren fuertemente retenidos (cenizas, carbón, etc) es más aconsejable el procedimiento de soxhlet.

d) Extracción mediante fluidos supercríticos

Actualmente los fluidos supercríticos se emplean de manera análoga a los eluyentes en la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) o a los gases portadores en Cromatografía de Gases (CG). Su aplicación en métodos de

extracción (127-129) y de manera especial en el caso de partículas y compuestos orgánicos derivados del petróleo y del carbón, está teniendo un notable interés (130-132).

Las principales ventajas de su aplicación están basadas en las propiedades que presentan los fluidos supercríticos, que en función de su presión, temperatura y composición, resultan ser intermedias entre las características de los gases y los líquidos. Una propiedad importante de estos fluidos supercríticos es que por encima de la temperatura crítica, la compresibilidad del fluido es grande y con pequeñas variaciones de presión pueden originarse cambios importantes en la densidad del fluido pudiendo ser de órdenes de 100-1000 veces mayores que en un gas, las características de solvatación son semejantes a las de un líquido, en cambio, los coeficientes de difusión y la viscosidad se mantienen como las de un gas, de ahí su gran aplicación.

Existen publicaciones con buenos resultados, aunque el principal inconveniente es la instrumentación necesaria para desarrollar estos procedimientos que representa un alto coste para la realización de muestras rutinarias de laboratorio.

Tanto el procedimiento soxhlet como el de ultrasonidos han sido adoptados por las normas internacionales: La técnica de soxhlet por la American Society for Testing and Materials (ASTM) en la determinación de PAHs en la materia particulada del aire (133), y la de ultrasonidos es la recomendada por el National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) como método de extracción de partículas en el aire (134).

1.2.2.2. Purificación o clean-up

Los métodos de purificación están orientados a separar los compuestos por familias químicas, basados en los diferentes coeficientes de reparto, equilibrios de adsorción-desorción, etc, que los compuestos presentan frente a distintos disolventes, adsorbentes, etc.

Los procedimientos de purificación más utilizados son fundamentalmente:

- a) Reparto líquido-líquido
- b) Adsorción y purificación en columnas cromatográficas abiertas
- c) Elución en columna por procedimientos de HPLC

a) Reparto líquido-líquido

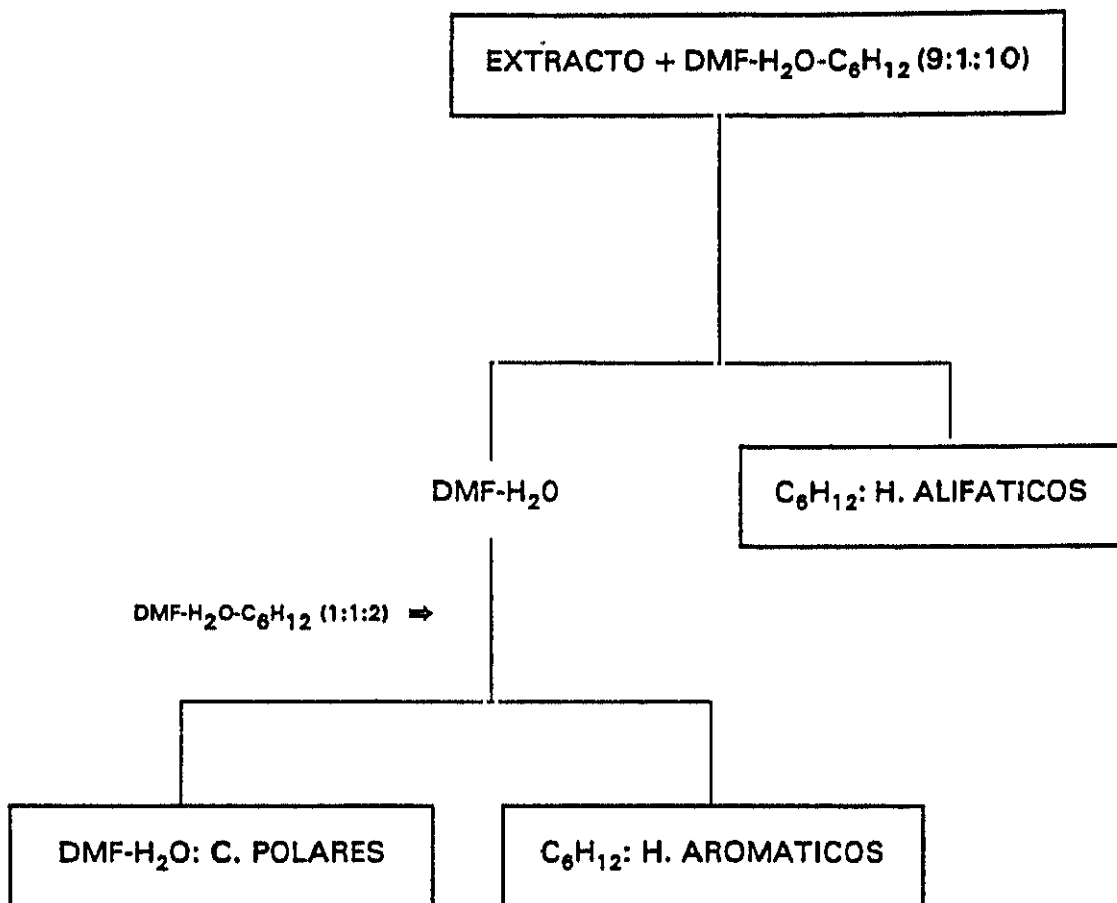
Determinados grupos de compuestos, concretamente los PAHs, hidrocarburos alifáticos, y algunos otros más polares, pueden separarse del resto de los compuestos presentes en una muestra o extracto por un proceso de reparto entre un disolvente no miscible con el anterior de diferente naturaleza polar.

Si el coeficiente de reparto de un determinado grupo de compuestos se diferencia de forma notoria de los del resto de los componentes, podrá ser retenido sin dificultad en el disolvente más afín con el consiguiente enriquecimiento del mismo en dicho disolvente.

Con estas técnicas de reparto se han obtenido resultados interesantes para la separación de hidrocarburos aromáticos policíclicos de otras sustancias con la utilización de metanol y nitrometano (135), acetona (136), dimetilformamida (137) o dimetilsulfóxido (138).

Estudios de eficacia de separación demuestran que son necesarias tres extracciones para obtener una recuperación de 95.78% para 14 PAHs ensayados con la combinación ciclohexano-nitrometano y dos extracciones para la combinación ciclohexano-metanol-agua con una recuperación de 95.14%. Mediante una tercera combinación, ciclohexano-dimetilformamida-agua, se consiguió una recuperación de 90.71% con una sola extracción. Los métodos de reparto líquido-líquido requieren separaciones minuciosas y precisas de las fases, pues de lo contrario, los componentes a separar pueden quedar repartidos entre ambos disolventes. Una separación defectuosa llevaría implícito el reparto de los componentes entre los disolventes, efecto que podría agravarse si a la vez se producen emulsiones durante la agitación. Para evitarla y conseguir una separación correcta se precisa dejar el sistema en reposo durante largos períodos de tiempo.

El esquema de un proceso de este tipo de separaciones se representa a continuación.



Esquema de extracción de PAHs por reparto líquido-líquido

Cuanto más largo sea el procedimiento de separación, mayores posibilidades existen de pérdida y de contaminación de extractos. Jaklin ha estudiado este tipo de pérdidas y ha observado que aumentan a medida que disminuye el peso molecular: 10% para el coroneno, $P_n = 300$ y un 43% para el naftaleno, $P_n = 128$ (139).

b) Adsorción y purificación en columnas cromatográficas abiertas

A continuación se indican dichos procesos tomando como base los tipos de columnas utilizadas.

Columnas clásicas

La adsorción cromatográfica en columnas clásicas de relleno con distintos adsorbentes: gel de sílice, alúmina o florisil, se emplea habitualmente para la separación de compuestos orgánicos presentes en un determinado extracto en el que se hace necesaria una separación por clases de compuestos.

En la tabla 7 se indican las características de los tres tipos de adsorbentes utilizados en el proceso de purificación o de preparación de la muestra

TABLA 7

Características de los adsorbentes

Adsorbentes	Características
Alúmina $Al(OH)_3$	<ul style="list-style-type: none"> - Contiene álcalis libres (básica). - Posibles reacciones: condensaciones aldol, deshidratación.
Gel de sílice $SiO_2 \times H_2O$	<ul style="list-style-type: none"> - Selectividad potencialmente mayor que la alúmina. - Mayor inercia que la alúmina. - Mayor capacidad de adsorción.
Florisil Mg_2SiO_4	<ul style="list-style-type: none"> - Es el más apropiado para efectuar la purificación de muestras de sedimentos (140).

La separación de una mezcla de sustancias en una columna cromatográfica es el resultado de dos procesos distintos, por una parte cada soluto se mueve formando bandas separadas y por otra, las bandas se mantienen lo suficientemente estrechas como para permitir la elución discreta de cada uno de los solutos.

El movimiento de cada soluto dependerá de la capacidad de interacción de cada uno de ellos con la fase estacionaria. Cuanto mayor sea la atracción por la fase estacionaria más fuertemente será retenido el compuesto por la columna. Aquellos analitos que interaccionen más fuertemente con la fase móvil serán eluidos más rápidamente por la misma.

La retención de los solutos o la selectividad de la columna dependerá de la naturaleza y del alcance de las fuerzas intermoleculares entre el soluto y la fase estacionaria (141).

Una de las propiedades fundamentales de estos adsorbentes es su alta capacidad de adsorción que puede conducir a pérdidas de analitos por una degradación catalítica o una adsorción irreversible que provoca un ensanchamiento de la banda cromatográfica y a pobres recuperaciones por un solapamiento entre distintos componentes (142)

Cartuchos

Actualmente existen pequeñas columnas cromatográficas comercializadas bajo diferentes nombres, Sep pak, Chromabond, rellenas de adsorbentes de fase ligada para la purificación de la muestra o bien para su preconcentración o preparación, dependiendo de la naturaleza de la misma.

Químicamente son muy similares a los empaquetamientos usados en HPLC excepto que son de un diámetro medio de partícula mayor, hasta 40 μm , lo que facilita el paso de muestra a su través. El soporte inorgánico inerte se basa también en material de sílice.

Existen varios tipos de cartuchos: Columnas de sílica gel, de cambio iónico, polares y no polares entre las que se encuentran las fases ligadas octil (C8) y octadecilsilano (ODS, C18). Éstas se encuentran en columnas de polietileno, en cantidades de 100-1000 mg., que están

protegidas por dos membranas de polietileno, llamadas "fritas", de 20 μm de espesor (143) (figura 8).

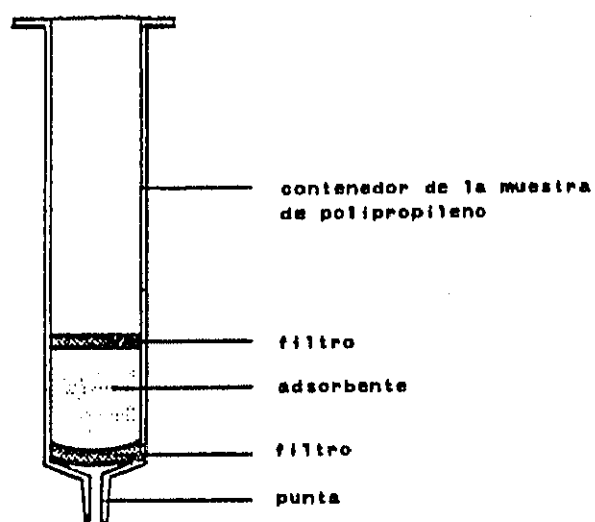


FIGURA 8: Diseño de un cartucho tipo Vac

En la tabla 8 se resumen las características de los adsorbentes de fase ligada sobre sílice más utilizados.

TABLA 8

Características de los adsorbentes de fase ligada

Adsorbente	Aplicaciones típicas	Muestras
Octadecilo	Extracción en fase inversa de compuestos no polares	Drogas, pesticidas, Aceites esenciales, conservantes, vitaminas, plastificantes, esteroides, hidrocarburos...
Octilo	Extrac. en fase inversa de comp. moderadamente polares que se retienen excesivamente en ODS	Pesticidas, contaminantes prioritarios
Cianopropilo	Extrac. en fase normal de comp. polares	Aminas, alcoholes, vitaminas, fenoles...
Sílica gel	Adsorción de compuestos polares	Drogas, alcaloides, amino ácidos, heterociclos, lípidos, terpenos, ácidos orgánicos, vitaminas...
Diol	Similar a Sílica gel	Proteínas, péptidos, tensioactivos
Aminopropilo	Débil extracción de cambio iónico	Hidratos de carbono, péptidos, esteroides, vitaminas...
Dimetilaminopropilo	Débil extracción de cambio aniónico	Aminoácidos
Acido sulfónico (aromático)	Fuerte extrac. de cambio catiónico en fase inversa	Aminoácidos, catecolaminas, nucleósidos
Amina cuaternaria	Fuerte extrac. de cambio iónico	Antibióticos, nucleótidos, ácidos nucleicos

La extracción en fase sólida (SPE) tiene la ventaja de que existen diferentes tipos de interacciones (no-polar, polar, intercambio iónico) entre los compuestos de la muestra, un adsorbente sólido y un eluyente adecuado. En la extracción en fase sólida es frecuente la existencia de más de un tipo de interacción.

Contrariamente a la extracción líquido-líquido convencional, la extracción en fase sólida ahorra disolvente y tiempo. Debido a la combinación de las diferentes interacciones, el método se caracteriza por un elevado grado de versatilidad. Por otra parte los problemas de tiempo o la formación de emulsiones estables, no existen en la separación de fase.

La extracción en fase sólida y preconcentración de trazas de componentes orgánicos contaminantes concretamente en muestras de agua, presenta ciertas ventajas sobre otras técnicas de concentración tradicionales como la extracción líquido-líquido, obteniéndose mayor recuperación, repetitividad y reproducibilidad, además de agilizar y economizar el procedimiento.

Una fuente de vacío sirve para facilitar el paso rápido de muestra a través del cartucho. Se pueden obtener con este sistema recuperaciones medias entre 80 y 100% .

El bajo coste, alta capacidad de adsorción, amplio intervalo de selectividad y simplicidad han contribuido al desarrollo de esta técnica de extracción sólido-líquido en los últimos años (144).

c) Elución en columna por procedimientos de HPLC

Actualmente la técnica de cromatografía líquida de alta resolución está siendo empleada para la purificación de extractos procedentes de distintos tipos de muestras (139). La utilidad de esta técnica está basada en la separación por familias o grupos, fundamentalmente: hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, PAHs con heteroátomos sustituidos (S-PAH, N-PAH, O-PAH)... Mediante esta técnica los compuestos de una misma familia eluyen conjuntamente.

De la revisión bibliográfica se deduce que las columnas más efectivas para la separación de PAHs son del tipo μ -Bondapack-NH₂, μ -Bondapack-CN, μ -Porasil o Nucleosil-NO₂ (145-147).

Los disolventes empleados con esta técnica en fase normal son fundamentalmente: n-hexano n-heptano o ciclohexano; y cuando se realiza en gradiente se utiliza cloroformo o cloruro de metileno.

Los extractos procedentes de la elución en fase normal mediante HPLC contienen separadamente hidrocarburos alifáticos e hidrocarburos aromáticos que posteriormente se analizan por cromatografía de gases o por HPLC en fase reversa.

1.3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS EN LA DETERMINACIÓN DE PAHs

En este apartado se resumen los métodos utilizados en la determinación de PAHs de acuerdo con la revisión bibliográfica.

La clasificación se ha efectuado teniendo en cuenta las distintas técnicas empleadas, y dentro de cada una se clasifican según el detector utilizado.

1.3.1. Técnicas cromatográficas

1.3.1.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

a) Detección Fluorimétrica

<u>CONDICIONES</u>			<u>MUESTRA</u>	<u>L. DETEC.</u>		<u>ANALITOS</u>	<u>OTROS DATOS</u>	<u>REF.</u>
<u>Fase móvil</u>	<u>λ, nm</u>	<u>Columna</u>		<u>ng</u>	<u>ppb</u>			
Aq.(40-100%) Acetonitrilo	250 370	Supelco- sil,C-18	Aerosol atmosférico	20		B(a)p	Precisión: <10%	148
Aq.-Acetoni- trilo	280-410 340-436	Vydac, TPRP	Agua de be- bida		0.01	PAHs		149
Aq.-Acetoni- trilo		Zorbax ODS	Agua potable		0.001- 0.0017	(7 PAHs)		150
Aq.-80%Aceto- nitrilo		Lichro- sorb/RP	Alimentos		0.5-3 0.1	Antraceno B(a)p	Recuperac.: 82 a 103%	151

Aq.: Agua

CONDICIONES			MUESTRA	L. DETEC.		ANALITOS	OTROS DATOS	REF.
Fase móvil	λ , nm	Columna		ng	ppb			
Aq. y metanol Acetonitrilo (1:1)	333 390	Zorbax ODS	Cebada		0.1	B(a)p		152
Aq.-Acetoni- trilo	280 389	Vydac 201 TP	Alimentos		0.002- 0.09	B(a)a		153
Aq.-80%Aceto- nitrilo	254 360	Zorbax ODS	Pescados, se- dimentos y plantas		30, 3 y 30 respect.	Fluoreno		154
Acetonitri- lo/etanol/ agua(7:6:7)	280 370	μ Bonda- pak C-18	Agua potable		0.003 0.03	Fluoranteno B(ghi)p		155
Aq.-metanol Aq.-Acetoni- trilo		μ Bonda- pak C-18 Porasil	Aguas re- siduales	4		B(ghi)p		156
Aq.95%Aceto- nitrilo-Meta- nol(1:1)	287 310	RP-18	Cerveza		> 0.5	B(ghi)p		157
Aq.-80%Ace- tonitrilo	381 403	Vydac 201-TP	Ceniza		2.67	B(a)p	Intervalo: hasta 100ppb	158
Aq.-80%Ace- tonitrilo	370 406	Nucleo- silC-18	Aerosol at- mosférico	0.05		B(a)p	Intervalo: 48.7-146 ng	159
Aq.-96%Meta- nol		Mercko- sorb-5- RP-18	Aerosol at- mosférico			B(a)p	L.D.: 0.15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	160
Aq.-80%-100% Metanol	365 403	μ Bonda- pak-C-18	Agua de mar		0.04	B(a)p		161

CONDICIONES			MUESTRA	L. DETEC.		ANALITOS	OTROS DATOS	REF.
Fase móvil	λ , nm	Columna		ng	ppb			
Aq.-80%-100% Acetonitrilo	365 389	Lichro- sorb- RP-18	Orina		0.001	B(a)p		162
Aq.-90%Ace- tonitrilo	368 406	Lichro- sorb- RP-18	Aerosol at- mosférico		0.016	B(a)p		163
Hexano	325 a385 408	Lichro- sorb- Si-80	Aceite de petróleo		5	B(a)p		164
Aq.-80%Ace- tonitrilo		HC-ODS	Agua potable y de río		5	B(ghi)p		165
Aq.82% - 100% Metanol		Lichro- sorb- RP-18	Café tosta- do		> 0.1	B(a)p	Precisión 3% (n=4)	166
Aq.-Acetoni- trilo(2:3)		Vydac 20 TP 54- C-18	Crustáceos		0.25- 10	9 PAHs	Precisión 0 - 17%	167
Aq.-Acetoni- trilo	340 425	Brownlee C-18	Aire particulado		0.02- 0.3	9 PAHs 12 PAHs		168
Aq.-80%Ace- tonitrilo	290 438	Spheri- sorb- ODS-2	Agua Aire		0.007 0.010	PAHs 5 PAHs		169
Aq-5-100% Acetonitrilo	280 410	Baker- bond- C-18	Suelo y aceite		0.003- 0.030	PAH		170

CONDICIONES			MUESTRA	L. DETEC.		ANALITOS	OTROS DATOS	REF.
Fase móvil	λ , nm	Columna		ng	pcb			
Aq.-95%Meta- nol	254 375	Radial- Pak-C-18	Patrón	0.7		Pireno		171
Aq.-70%Ace- tonitrilo	334 363	HC-ODS	Patrones	0.2 a 0.0013		10 PAHs <20 pg.	Laser	172
Aq.-70%Ace- tonitrilo	308 425	Spheri- sorb- ODS	Patrones		40 a 4000	Naftaleno Antraceno		173
Aq.-MeOH y 100% Aceto- nitrilo	310 440	Lichro- sorb- RP-18	Aceites usados como disper- santes en her- bicidas.			12 PAHs	Contenido: 30 a 1130 mg/Kg.	174
Aq.-90%Meta- nol	370 406	C-18-	Aceites de motor	4 ng/g		B(a)p	Recuperac.: 94.5 a 89.3%	175
Aq.-80%Ace- tonitrilo	290 438	Spheri- sorb- ODS-2	Agua Aire	0.008 0.0096 0.010		B(a)p B(ghi)p Fluoranteno 5 PAHs	Recuperac.: 79.5 a 95.9% Concn.:217- 3792 pg/m ³	176
Aq.-Aceto- nitrilo(grad)	Progra- madas	Baker- bond Wi- de Pore C-18	Agua Aceite Aceite usado		0.010 10mg/Kg $2 \cdot 10^4$	PAHs " "	Recuperac.: del 90-95%	177
Aq.-80%Ace- tonitrilo	254 320-490	Si-C-18 Zorbax- C-8	Agua		50	PAHs	Uso de mi- crocolumnas	178

CONDICIONES			MUESTRA	L. DETEC.		ANALITOS	OTROS DATOS	REF.
Fase móvil	λ , nm	Columna		ng	ppb			
Aq.-60 a 90% de Acetonitrilo T _a =30°C	290 385	Spherisorb-ODS-2	Aire urbano			PAHs	Variac. de la conc. con la época del año.	179
Aq. Acetonitrilo (grad.)	381 405	RP-18	Alimentos		1	B(a)p	Coefficiente de variac.: 1 a 3 ppm	180
SDS-0.024M	Programable	Alquilnitril	Patrones		2.50-0.20	6 PAHs		181
Aq. Acetonitrilo (grad.)	Programable	Radial Pak-C18	Aire	0.1-1.0		PAHs		182
Aq.-Acetonitrilo	340-425	Spherisorb 5 RP-18	Ostras			B(ghi)perilen. B(a)P, B(a)A, Db(ah)A y otros	Uso de precolumna.	183
Aq.(55-100) Acetonitrilo 34 min. y Acetonitrilo/acetato de etilo (1:1) 10 min.	280-378 296-410 300-500 290-450	Vydac 201-TP 54	Aceites y productos grasos			PAHs	L.D.: 1µg/Kg Recuperac.: 78 a 100%	184
Aq.-Acetonitrilo		Gynkotek Intersil ODS II	Agua de bebida y agua embalsada			PAHs	Cartucho C-18 (eluyente THF)	185
Aq.(50-100) Acetonitrilo		Vydac 201-TP 54	Mejillones, ostras, almejas, carne de cangrejo y salmón		0.01-0.6	12 PAHs	Recuperac.: 76 a 94%	186
Aq.- metanol	254, 278, 300 - 364	Hypersil HP ODS	Aire			B(a)P, B(ghi)per. y otros	Eluyente ciclohexano	187

b) Detección Fotométrica.

CONDICIONES			MUESTRA	L. DETEC.		ANALITOS	OTROS DATOS	REF.
Fase móvil	λ , nm	Columna		ng	ppb			
Aq.-Metanol/ Acetonitrilo (1:1)		Zorbax ODS	Cebada			B(a)p		152
Aq.-80%Ace- tonitrilo	254	Zorbax ODS	Pescados, se- dimenos y plantas.			Fluoreno		154
Aq. 5%Aceto- nitrilo-Meta- nol(1:1)		RP-18	Cerveza			B(ghi)p		157
Aq.-Acetoni- trilo	190- 450	Lichrosorb RP-18	Agua con- taminada		< 50	Criseno		188
Aq.-80%-100% Acetonitrilo	254	Vydac 201 TP	Ambiental		0.009	B(a)p	Diodo Array	189
Aq.-50%-100% Acetonitrilo	280 365	Polymeric C-18	Suelo con- taminado	0.1 a 5		16 PAHs	Diodo Array	190
Acetonitri- lo/Metanol	254	Kontron PAC 254- 400	Agua de be- bida		0.007	6 PAHs		191
Aq.-80%Ace- tonitrilo	254	Separon SGX18	Tejido de rata		20	Pireno, fluoran- teno y B(a)a		192
Aq.-Aceto- nitrilo (grad.)	254	ChromSpher PAH	Patrones			16 PAHs	Tiempo de análisis 22 min	193
Aq.(80-100) Acetonitrilo	254	C-18	Aire particulado			PAHs	L.D.: 0.1-0.5 ng/m ³	194

1.3.1.2. Cromatografía de Gases (GC).

DETECCIÓN	CONDICIONES		MUESTRA	L. DETEC.		ANALITOS	OTROS DATOS	REF.
	Ta °C	Gas		ng	ppb			
M.S.	85-270		Lodo			PAHs	Intervalo: 1 a 100ppb	195
M.S.	75-320		Suelos		0.004	B(e)P y B(a)p	Recuperac.: del 82%	196
M.S.	150-250	Metano	Gases de mo- tores y aero- sol atmosfér.	0.05		B(a)p	Precisión 1 - 6%	197
M.S.	240	He	Productos cárnicos		ppb	B(a)p	Altos nive- les en pro- ductos ahu- mados.	198
M.S.	200-300	Metano	Crudo de petróleo	>0.001		B(a)p B(e)p	B(a)p/ B(e)p=100	199
M.S.	0-275	He	Sedimento contaminado		1000	PAHs	Detección simultánea	200
F.I.D.	110-270		Aerosol atmosférico	0.05 0.1		Criseno y B(a)p	Intervalo: <0.1ng/m ³ de aire.	201
F.I.D.	100-500	N ₂	Suelos		5	PAHs		202

DETECCIÓN	CONDICIONES		MUESTRA	L. DETEC.		ANALITOS	OTROS DATOS	REF.
	Ta °C	Gas		ng	ppb			
F.I.D.	35-150-220	N ₂	Agua	0.010 0.043		PAHs	Recuperación: >70%	203
F.I.D.	120-280	N ₂	Mejillones y pescados	4000- 20000		4 PAHs	Recuperación: 49 a 97%.	204
F.I.D. M.S.	110-280	H ₂	Aire			PAHs	Recuperación: 83-105.7%. L.D.: 2µg/m ³	205
M.S.	70-280	He	Aceites naturales, pescados ahumados, mejillones y ostras.	0.1		PAHs	Tiempo de análisis = 50 min.	206
F.I.D.	280		Suelo	15 a 35		PAHs	Recuperación: 80-90% Naftaleno: 66%.	207
M.S.	35-280	He	Patrón			PAHs	Columna: capilar SE-54	208

DETECCIÓN	CONDICIONES		MUESTRA	L. DETEC.		ANALITOS	OTROS DATOS	REF.
	Ta °C	Gas		ng	ppb			
F.I.D.	80-280	N ₂	Patrones	10 a 45		12 PAHs	Doble pa- trón interno	209
M.S.	50-280	H ₂	Carbón			15 PAHs	Identifica- ción y es- pectros.	210
M.S.	140-260	N ₂	Aire			B(a)p y otros contami- nantes.	Columna ca- pilar SE-30	211
F.I.D.	250-280 (5°C/min)	N ₂	Agua residual			Fluoranteno, pireno, B(a)a, B(a)p y B(b)fluoranteno	Columna: Dexsil-300	212
M.S.	50-300 (10°C/min)	He	Sedimentos de costa mediterránea			PAHs	precisión 7-10%	213
M.S.	30-300	Helio	Aire particulado			PAHs	L.D.: 0.1-0.5 ng/m ³	194
M.S.		Helio	Ostras			Fenantreno, antra- ceno, fluoranteno, pireno y criseno	Columna: DB- 5 (0.1µm)	183
M.S.	65-320 (10° min ⁻¹) ó 340(5° min ⁻¹)	Helio	Agua			PAHs	Columna: RT _x - 5 (0.25µm)	214

M.S. : Espectrometría de masas.
F.I.D. : Detector de ionización de llama.

1.3.1.3. Cromatografía en Capa Fina (TLC).

DETECCIÓN	CONDICIONES		MUESTRA	L. DETEC.		ANALITOS	OTROS DATOS	REF
	Fase móvil	λ , nm		ng	ppb			
Fluorimétrica	Ciclohexano	298 403 a 428	Sedimento marino		2.5	B(a)p	Recuperación: 70%	215
Fluorimétrica	Etanol/Tolueno/Agua (17:4:4)	300 406	Aerosol atmosférico	0.005		B(a)p		216
Fluorimétrica	Hexano/Benceno(2:1)	290 420	Rocas		ppb	PAHs		217
Fluorimétrica	Di-isopropiléter/Hexano(4:1)	365 430	Patrones	40 a 200		PAHs		218
Fluorimétrica derivada.	Benceno	369 380	Agua de suministro		1×10^{-5}	B(a)p	Intervalo: 0.54-1.08 en ng/l	219
U.V.-Visible	2,2,4-Tri-metilpentano/piridina(19:1)		Aceite vegetal		1000 a 5000	B(a)a		220
Fluorimétrica	Acetona		Agua			B(a)p y fluoreno	Recuperación: 90-95%. $s_p=4.6\%$ (n=8)	221

1.3.1.4. Otras cromatografías.

En este apartado se incluyen las determinaciones cromatográficas menos utilizadas de acuerdo con la revisión bibliográfica, algunas de ellas se encuentran actualmente en pleno desarrollo.

TÉCNICA	CONDICIONES		MUESTRA	L. DETEC.		ANALITOS	OTROS DATOS	REF.
	Detección	Fase móvil		ng	ppb			
C.L.	UV-Visible 283nm	Etanol/1,2 dicloroe- tano(1:1)	Humo de ci- garrillos		960	B(a)p		222
C.L.	Fluorime. Ex.:384nm Em.:405nm	Dimetil- formamida	Pulmones humanos			B(a)p	Intervalo: 1 a 1000ppb	223
G.L.C.	F.I.D.	N ₂	Tejidos de ratas	50		B(a)a	265°C	224
G.L.C.	F.I.D.	N ₂	Germen de trigo		500	Naftaleno	150°C	225
HPLC	M.S.	Aq.-Meta- nol	Patrones	10		4 PAHs		226
HPLC	Fotoioni- zación	Aq.-90% Metanol	Patrones	0.05 a 5		28 PAHs	Láser	227

TÉCNICA	CONDICIONES		MUESTRA	L. DETEC.		ANALITOS	OTROS DATOS	REF.
	Detección	Fase móvil		ng	ppb			
HPLC	Rotación óptico- magnética	Aq.-Aceto- nitrilo/ Metanol	Patrones	190 160 240		Fenantreno Pireno B(b)fluoran- teno.	Considera- ciones teó- ricas.	228
HPLC	Amperomé- trica: -0.4V y -0.6V	2-propa- nol/0.05M- NaH ₂ PO ₄ (3:7).	Patrones		5 50 50	Fenantreno Naftaleno Pireno	Uso de Ce como agente derivatizan- te.	229
HPLC	Fotoacús- tica/ 280 nm	Metanol	Patrones		5	B(a)p	Caudal de célula: 3.8µl	230

C.L. : Cromatografía líquida
G.L.C.: Cromatografía Gas-Líquido

1.3.2. Técnicas Luminiscentes.

1.3.2.1. Espectofluorimetría.

MODALIDAD	CONDICIONES			MUESTRA	L.DETEC.		ANALITOS	OTROS DATOS	REF.
	Medio	λ , nm	TA		ng	ppb			
	Hexano	323 387	Amb.	Tejidos de animales		10	Naftaleno	Intervalo: 1500 - 17000 ppb	231
	Ciclohexano	375 400	Amb.	Carbazol			Antraceno	Recup.: 100% nivel 100ppb	232
403	Xilano	318	Amb.	Fenantreno		50	Antraceno		233
	Hexano	390 403	Amb.	Productos cosméticos		5600	B(a)p		234
Derivada	Metanol	Em.:334	Amb.	Agua residual		3.0	Pireno		235
Sincrónica	Xilano	Em.:384	Amb.	Fluoranteno		100	Antraceno		236
Sincrónica	Etolol	Ex.:373- 433 $\Delta\lambda=3nm$	Amb.	Patrones			Antraceno, B(a)p B(ghi)p	L.D.:2.2 - 98 nM	237
Sincrónica	Dibenzo- furano	Em.:384	Amb.	Patrones		2000	Antraceno		238

MODALIDAD	CONDICIONES			MUESTRA	L. DETEC.		ANALITOS	OTROS DATOS	REF.
	Medio	λ, nm	Tª		ng	ppb			
	Octano	Ex.:260 a 380	10K	Sedimentos de lago		1.8 a 12.9	4 PAHs		239
A baja Tª	Ciclo- hexano			Hamburguesas		0.9	B(a)p otros PAHs	Recup.: 70 a 74%	240
A baja Tª	Hexano			Agua sub- terránea		>10	PAHs		241
Exc. Láser	Aq.-55% Metanol	Ex.:351 Em.:381	Amb.	Patrones		0.017	Pireno	Intervalo: 0.018 a 16 nM.	242
	Hexano		30°C	Águas minerales		0.01	PAHs	Patrón externo	243
Tiempo resuelto	Hexano		77K	Aire particulado	< 10 < 10 100		Antraceno Pireno Fluoranteno		244
	Acuoso		Amb.	Patrones		0.018	Pireno y otros PAHs		245

1.3.2.2. Espectrofotometría.

MODALIDAD	CONDICIONES			MUESTRA	L. DETEC.		ANALITOS	OTROS DATOS	REF.
	Medio	λ , nm	T _a		ng	ppb			
	Acuoso	Ex.: 280-280 Em.: 300-650	77K	Agua salada	2 800		Naftaleno Fenantreno		246
	Agua/ Etanol (9:1)		77K	Patrón			Fenantreno		247
	Heptano		77K	Patrones		3000 2000 8	Antraceno Naftaleno Pireno		248
	Heptano		4,2K	Patrones			B(e)P		249
	Acuoso	Ex.: 280-280 Em.: 300-650	77K	Patrones			12 PAHs	Uso de átomos pesados	250
Papel		Em.: 185-700	Amb.	Carbón	1		Fenantreno	Exc. Sincrónica	251
Papel			Amb.	Patrón	0.5		B(a)p	Uso de átomos pesados	252
Fibra óptica	Heptano		77K	Patrones			Antraceno Coroneno pireno	L. D.: 88 nM 840 nM 350 nm	253

1.3.3. Otras Técnicas.

TÉCNICA	CONDICIONES	MUESTRA	L. DETEC.		ANALITOS	OTROS DATOS	REF.
			ng	ppb			
Espectroscopía Raman	Medida: 217-800nm	Patrón		20	Pireno	Láser	254
Espectroscopía Raman	Sensibilización con coloides de Ag	Patrones	3.5-7		2 PAHs		255
M.S.		Partículas diesel	0.001		Fenantreno Antraceno		256
M.S.		Partículas diesel	$5 \cdot 10^{-5}$		9 PAHs		257
Voltametría		Hollín de motor		50	B(a)p	Electrodo de carbón	258
Voltametría		Agua de mar y de bebida		0.4	PAHs	Electrodos de Hg revestidos de fosfolípidos	259
Espectroscopía Emisión Molecular	Exc.: Descarga eléctrica Detec.: Diodo Array baja Tª		1200 5600 100 300		B(a)p Fluoranteno Perileno Pireno		260

<u>TÉCNICA</u>	<u>CONDICIONES</u>	<u>MUESTRA</u>	<u>L. DETEC.</u> ng ppb	<u>ANALITOS</u>	<u>OTROS DATOS</u>	<u>REF.</u>
UV-Visible		Patrones	300 800	PAHs		261
Espectrofotometría	655 nm	Patrón		Fluoreno	Intervalo: 1-16µg/ml Método rápido	282
Voltametría	C/Ag/Ag cl	Agua Hierba y hojas	0.003 0.071 20 a 370	B(a)p y otros	Precisión 10-32% (n=3-5)	283

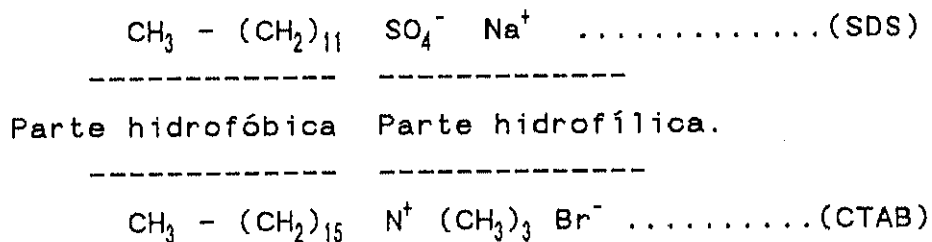
1.4. GENERALIDADES SOBRE TENSIOACTIVOS Y MICELAS

1.4.1. Definición y clasificación de los tensioactivos

Los tensioactivos son, en su mayoría, compuestos orgánicos que presentan una estructura molecular característica. La molécula posee dos partes bien diferenciadas, una polar (cabeza) y otra apolar (cola). La parte polar o hidrófila de la molécula puede tener carga positiva o negativa, no tener carga o ser anfótera. La parte apolar o hidrofóbica de la molécula es generalmente una cadena hidrocarbonada aunque hay un gran número de compuestos, que incluyen moléculas de interés biológico, con grupos aromáticos hidrofóbicos.

Frecuentemente la molécula de tensioactivo exige la presencia de un grupo funcional neutro (éster, éter, amida,...) que une la parte hidrofóbica con la hidrofílica.

A modo de ejemplo se representan las estructuras del dodecil sulfato de sodio (SDS) y bromuro de cetil (hexadecil) trimetil amonio (CTAB)



Los tensioactivos se clasifican tomando como base la naturaleza de la parte hidrofílica en, (264):

- a) Iónicos: catiónicos y aniónicos.
- b) No iónicos
- c) Anfóteros

a) Iónicos

Los catiónicos se caracterizan por tener en su molécula grupos amina, piridinio o piperidinio. Los aniónicos pueden estar formados por jabones, alcoholes grasos sulfatados, alcoholes polioxietilénicos sulfatados o aceites sulfatados. A este grupo pertenecen el CTAB y el SDS, tensioactivos objeto de estudio en este trabajo.

b) No iónicos

No presentan ninguna carga en su molécula y no se disocian en disolución acuosa. Su parte hidrófila proviene de la presencia de grupos polares no iónicos tipo alcohol, éter, carbonilo o a veces aminas. A este grupo pertenecen el tritón X-100, el pluronic F-68, el tween 80

c) Anfóteros

Pueden comportarse como aniónicos, catiónicos o no iónicos según el pH de la disolución. Suelen ser ácidos

aminocarboxílicos o ácidos grasos de proteínas condensadas. Pertenecen a este grupo el alquil amido betaina y el N-dodecil-N,N-dimetilbetaina.

1.4.2. Formación y estructura de las micelas

Cuando un tensioactivo se disuelve en agua a una concentración y temperaturas determinadas se forman las micelas. Una micela es una asociación de moléculas de tensioactivo.

Se puede considerar que la formación de micelas es un mecanismo que permite disminuir la energía interfacial de las moléculas de tensioactivo cuando todas las interfases están saturadas. La concentración a la cual se produce este fenómeno se llama concentración micelar crítica (CMC).

Para concentraciones inferiores a la CMC los tensioactivos existen en su mayor parte como monómeros. Por encima de la CMC tiene lugar un equilibrio dinámico entre los monómeros y las micelas.

Cada micela está formada por un cierto número de moléculas de tensioactivo (llamado número de agregación) que condiciona el tamaño y la geometría del sistema micelar.

Cuando se habla de micelas, normalmente se admite que son agregados de tensioactivo en medio acuoso. Sin embargo, la formación de asociaciones coloidales puede tener lugar también en disolventes no polares, en cuyo caso los agregados de tensioactivos reciben el nombre de micelas

invertidas.

En soluciones relativamente diluidas, las micelas son esféricas y relativamente pequeñas. Una representación clásica de micelas esféricas es la siguiente:

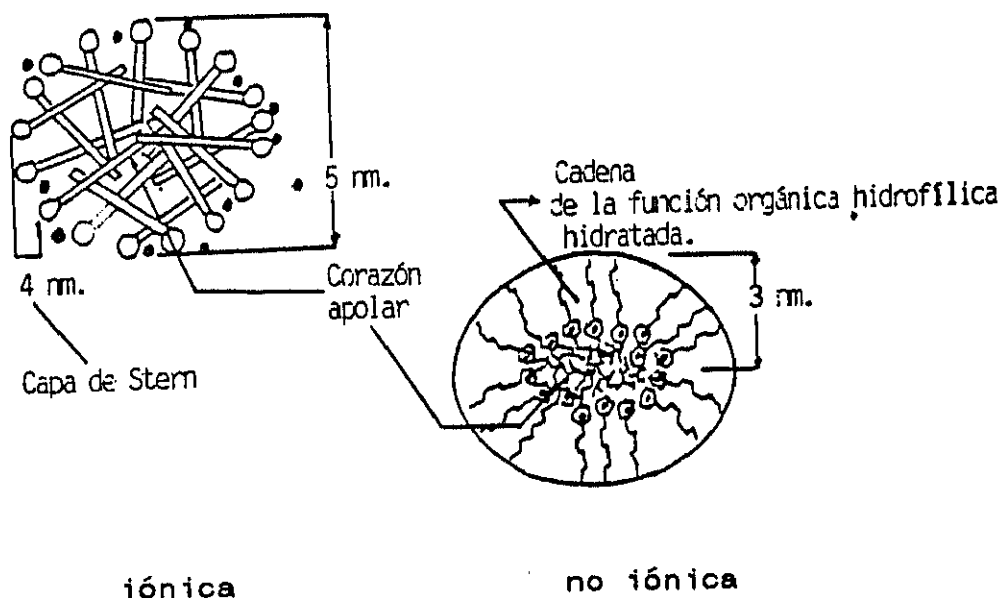


FIGURA 9: Representación gráfica convencional de micelas esféricas

Se distinguen las siguientes partes:

- El corazón apolar de la micela constituido por las colas de las moléculas de tensioactivo. El diámetro varía de

2 a 6 nm.

- La capa de Stern constituida por las cabezas polares aniónicas o catiónicas y de los contraiones asociados.

Este equilibrio entre las fuerzas hidrófobas y las fuerzas hidrófilas es el que permite la existencia de la micela. En el tamaño y la forma de la micela van a influir fuertemente la naturaleza del tensioactivo considerado, del contraión, y de los aditivos presentes. La adición de electrólitos a una disolución micelar facilita la formación de micelas por la disminución de las repulsiones electrostáticas entre las cabezas polares iónicas, disminuyendo la CMC y aumentando el tamaño de la micela.

Al aumentar la concentración, las micelas aumentan de tamaño y adquieren una estructura laminar. La teoría de la micela laminar supone que las moléculas de tensioactivo se organizan en forma de una doble capa, tal como se representa en la figura 10.

Las cabezas se encuentran dirigidas hacia afuera. Las micelas laminares se encuentran sólo en disoluciones concentradas (>10%). Los resultados de birrefringencia parecen apoyar esta teoría.

Ciertas micelas presentan una estructura en forma de varilla o bastoncillo, siendo la longitud de la varilla función de la cantidad de electrólito presente en la solución. Esta agrupación sería la representada en la figura 11.

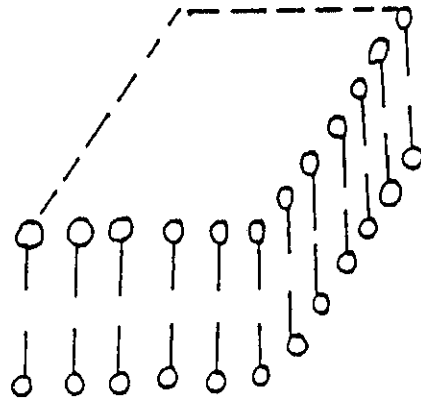


FIGURA 10: Estructura de una micela laminar.

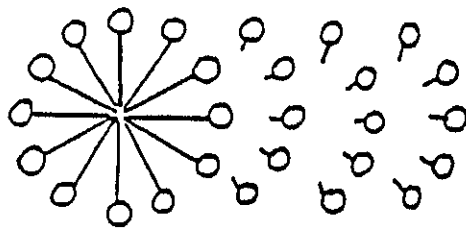


FIGURA 11: Micela en bastoncillo

1.4.3. Propiedades físicas de las soluciones micelares

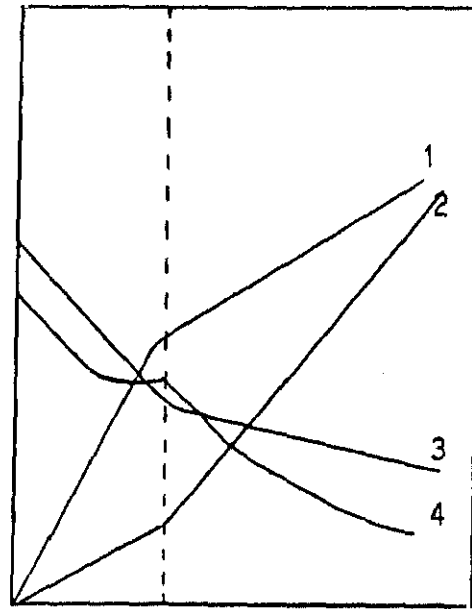
Las disoluciones de sustancias con actividad superficial alta presentan propiedades físicas especiales. En disoluciones diluídas actúan como electrolitos normales, pero a partir de determinadas concentraciones tienen lugar cambios bruscos en varias de sus propiedades físicas, tales como: la turbidez, presión osmótica, conductividad eléctrica y tensión superficial. El grado en que la presión osmótica aumenta con la concentración se hace anormalmente bajo, lo cual sugiere que está teniendo lugar una asociación molecular. Lo mismo ocurre con el resto de las propiedades; la conductividad eléctrica también experimenta variación aunque permanece su valor relativamente alto, lo cual indica que persiste la disociación iónica.

Lo dicho anteriormente queda reflejado fielmente en la variación de las propiedades físicas de las soluciones acuosas de SDS figura 12.

La agitación térmica y la repulsión electrostática entre las cabezas cargadas en la superficie de la micela se oponen a la tendencia a agregarse. Por consiguiente, cabe esperar una variación en la CMC debido a diferentes factores:

- Disminución de la CMC al aumentar la parte hidrofóbica de las moléculas de tensioactivo. Para una serie homóloga cada grupo CH_2 añadido hace que la CMC se haga la mitad.

Propiedades físicas



1. Presión osmótica
2. Turbidez
3. Tensión superficial.
4. Conductividad molar

c.m.c 0.01

0.02

Concentración molar ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

FIGURA 12: Variación de las propiedades físicas en soluciones acuosas de SDS

- La adición de sales tiene una gran influencia sobre la estructura físico-química de las micelas iónicas, disminución de la CMC, aumento del intervalo de la temperatura micelar, aumento del espesor de la micela y, por tanto de la viscosidad. Este efecto está menos acusado cuando se trata de soluciones micelares no iónicas (265).
- Temperatura: La variación de la CMC con la temperatura en el caso de tensioactivos iónicos (SDS), queda reflejado en la gráfica de la figura 13. Puede observarse la presencia de un mínimo en el intervalo de temperaturas

entre 20-30°C.

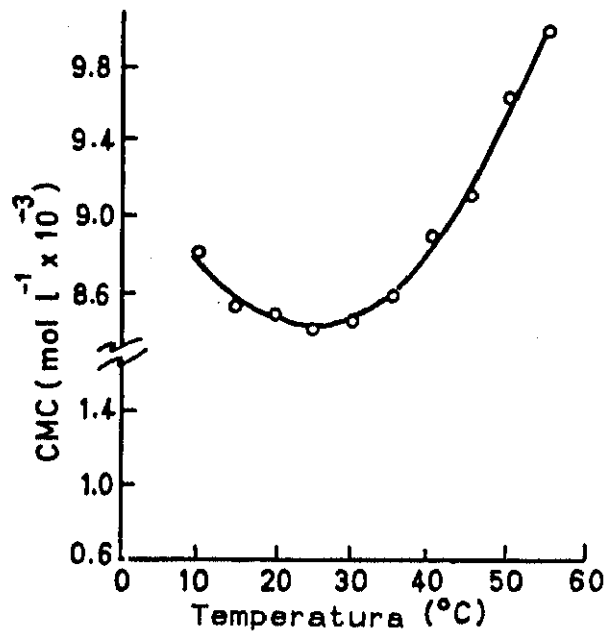


FIGURA 13: Variación de la CMC con la temperatura para el SDS

A temperaturas inferiores a 20 °C, la CMC disminuye a medida que aumenta la temperatura, esta disminución, posiblemente es debida a la deshidratación de los monómeros. A temperaturas superiores a 30°C, el aumento de temperatura se opone a la formación de micelas aumentando la CMC.

También se ha observado en el caso de los tensioactivos iónicos que disminuye el tamaño de la micela con el aumento de la temperatura (264).

- Presión: El efecto de la presión sobre el tamaño de la micela en disoluciones acuosas de SDS ha sido estudiado por Nishikido y col. (264). La variación del número de agregación en disoluciones de SDS en función de la presión a 30 °C se puede observar en la figura 14.

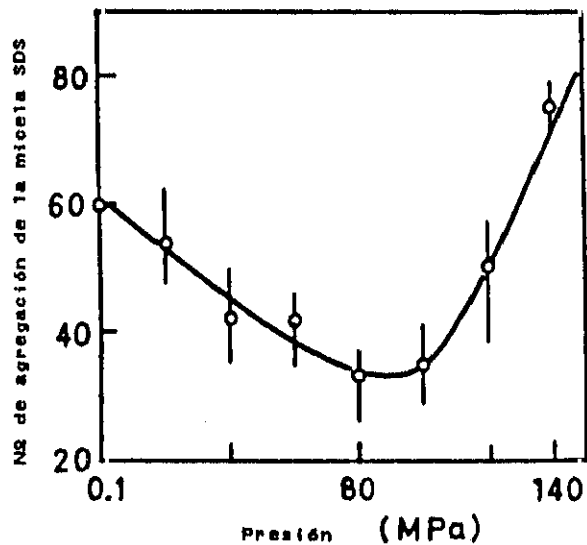


FIGURA 14: Influencia de la presión sobre el número de agregación.

En dicha figura se observa un mínimo para un valor de la presión próximo a 100 MPa ($1 \text{ atm} = 1.013 \times 10^5 \text{ Pa} = 0.1 \text{ MPa}$), que corresponde a un máximo en la curva CMC-P. Estos resultados indican que hasta 100 MPa la compresión favorece la disociación de las micelas en monómeros mientras que la asociación de monómeros tendrá lugar a presiones más elevadas.

- Adición de alcoholes. La adición de alcoholes de bajo peso molecular (metanol a butanol) a disoluciones de tensioactivos iónicos causa una disminución en la CMC, llegando a ser más pronunciada cuando aumenta la hidrofobicidad del alcohol. Varios autores han discutido el efecto de los alcoholes sobre la CMC basándose en términos de transferencia de energía libre estándar ΔG_p^0 (264). El factor principal de esta disminución en la CMC es debido a la reducción de la energía libre de la micela como consecuencia de la disminución de la densidad superficial de carga de la micela.

Bachlund y col. (264) estudiaron el efecto de n-alcoholes sobre el número de agregación, sugiriendo que los alcoholes solubles en agua (metanol a butanol) están predominantemente disueltos en la fase acuosa y aumenta o disminuye el número de agregación dependiendo de la concentración del alcohol. Para alcoholes moderadamente solubles (pentanol, hexanol) se distribuyen entre la fase acuosa y la fase micelar y a bajas concentraciones aumentan el número de agregación. Para alcoholes tales como heptanol y octanol, se solubilizan totalmente en la fase micelar aumentando el número de agregación.

1.4.4. Aplicaciones analíticas de las soluciones micelares

Las disoluciones micelares debido a las propiedades características que presentan tales como poder de solubilización, tensión superficial, presión osmótica, viscosidad, conductividad eléctrica, ..., han sido utilizadas con éxito en diferentes campos de aplicación,

entre ellos, en el de la Química Analítica bien para mejorar los métodos analíticos ya existentes o bien para desarrollar nuevos procedimientos ya que pueden mejorar notablemente las propiedades analíticas, selectividad, precisión y sensibilidad.

Los sistemas micelares han sido utilizados ampliamente en métodos espectroscópicos de análisis tales como absorción-UV, fluorescencia, fosforescencia, quimioluminiscencia, en métodos electroanalíticos, polarografía, valoraciones potenciométricas, en métodos de separación, tales como separación por flotación mediante espuma, filtración en gel, extracción líquido-líquido, cromatografía líquida de alta resolución,...

Teniendo en cuenta la aplicación que tienen los medios micelares en el presente trabajo de investigación, a continuación se hace un breve comentario acerca de las ventajas que ofrecen estos sistemas en luminiscencia molecular y en HPLC.

1.4.4.1. Luminiscencia en medio micelar

Una de las aplicaciones analíticas que presentan las soluciones micelares, es la de aumentar la sensibilidad y selectividad en la determinación de diferentes especies químicas cuando ésta se lleva a cabo fundamentalmente por técnicas luminiscentes.

Los métodos luminiscentes en particular, mejoran sus características analíticas cuando se trabaja en solución micelar. Entre otras razones se pueden aducir:

- Disminuyen los efectos de atenuación, ocasionados fundamentalmente por la presencia de especies paramagnéticas, debido a la inclusión de las moléculas en el interior de las micelas.
- Se incrementa el tiempo de vida media de los estados electrónicos excitados lo que conlleva a un aumento del rendimiento cuántico.
- Propiedades tales como la microcapilaridad, la microfluidez y la constante dieléctrica protegen los estados electrónicos singlete y triplete excitados frente a fenómenos de desactivación no radiacional tales como relajación vibracional, conversión interna, cruce intersistemas y conversión externa, aumentando de este modo la intensidad de luminiscencia (266-270 y 264).

Por consiguiente el hecho de incluirse las moléculas luminiscentes en el interior de las micelas puede dar lugar a diferentes efectos:

- Desplazamientos de las longitudes de onda excitación/emisión, lo que conlleva a un aumento de la selectividad.
- Aumento del rendimiento cuántico lo cual implica un aumento de la sensibilidad.
- El fenómeno de la fosforescencia que ordinariamente solo es observado a baja temperatura (77 K), puede observarse a temperatura ambiente utilizando estos medios rígidos debido a la protección del estado electrónico triplete excitado del entorno,

favoreciéndose de este modo la desactivación por fosforescencia (266).

1.4.4.2. Cromatografía líquida micelar

La denominación de cromatografía líquida micelar (CLM) fue introducida por primera vez por Armstrong y Henry en 1980 (271). Desde entonces, ha sido objeto de numerosos estudios teóricos y prácticos.

Los tensioactivos iónicos han sido utilizados extensamente, en cromatografía líquida, en fase móvil como agentes de interacción iónica, el beneficio obtenido vía este equilibrio secundario es altamente selectivo para la separación de solutos interaccionantes.

La separación por cromatografía líquida utilizando fase micelar es altamente específica, ya que combina interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y estéricas entre el soluto y la micela, lo cual no se puede conseguir con la cromatografía tradicional que utiliza un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes.

El término CLM describe la separación donde la partición significativa del soluto tiene lugar en los agregados discretos de la fase móvil en vez de en el seno del disolvente de la fase móvil. Otras ventajas de la CLM son: en primer lugar bajo coste de la fase móvil (solución micelar), posibilidad de cromatografiar analitos hidrófobos e hidrofílicos y por último que la pseudofase acuosa no es tóxica ni inflamable.

La elución de un soluto con un tensioactivo por debajo de la concentración micelar crítica CMC será la misma que en agua pura; esto es debido a que por debajo de la CMC no hay micelas con las cuales pueda haber partición del soluto.

En CLM la mayoría de las fases móviles son disoluciones acuosas, esto constituye el mayor interés de la técnica, ya que como se ha dicho anteriormente las soluciones micelares acuosas no son tóxicas, volátiles e inflamables.

a) Mecanismo de retención

En la figura 15, se esquematizan los equilibrios que tienen lugar en el interior de la columna en cromatografía micelar. Si se considera que hay tres fases:

fase acuosa (W)
fase micelar (M)
fase estacionaria (S)

Se pueden definir tres constantes de partición: K_{MW} : constante de partición del soluto entre las micelas y la fase acuosa, K_{SW} : constante de partición entre la fase estacionaria y la fase acuosa y K_{SM} : constante de partición

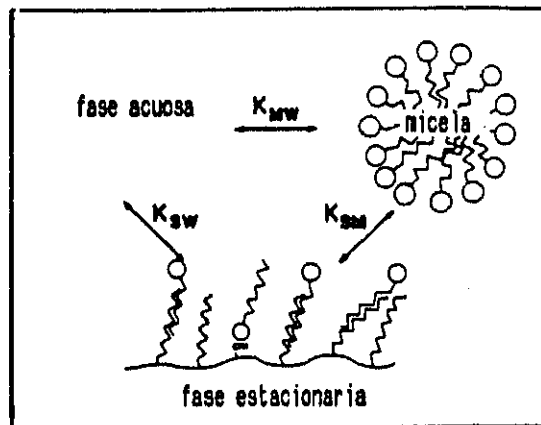


FIGURA 15: Equilibrio entre fase estacionaria, fase acuosa y micelas en CLM

entre la fase estacionaria y la fase micelar. Armstrong y Nome (272) han establecido la relación siguiente:

$$1/K' = 1/\phi \left(\frac{V (K_{MW} - 1)}{K_{SW}} C_m + 1/K_{SW} \right)$$

donde: K' es el factor de capacidad

ϕ el cociente V_s/V_0

V_s volumen de la fase estacionaria

V_0 volumen de la fase móvil en la columna (volumen muerto)

V volumen molar del tensioactivo

C_m es la concentración de tensioactivo en la fase

móvil en forma micelar, de manera que :

$$C_R = C_{total} - CMC$$

C_{total} concentración total de tensioactivo en la fase móvil.

La constante de partición K_{SM} puede ser determinada mediante el cociente K_{SM}/K_{MW} .

b) Selectividad en cromatografía líquida micelar

La selectividad en cromatografía líquida corresponde a las diferencias de retención entre dos solutos diferentes. El factor de selectividad es la relación entre los factores de capacidad K'_1/K'_2 de los dos solutos 1 y 2 considerados.

La selectividad particular obtenida en cromatografía micelar, es debida al equilibrio químico secundario (interacción soluto-micela) que ocurre en la fase móvil. Hay que tener en cuenta los efectos hidrofóbicos como en cromatografía clásica, y además los efectos electrostáticos. Se ha demostrado que las interacciones hidrofóbicas son principalmente las responsables de la solubilización de solutos orgánicos, pero la selectividad está controlada por las interacciones electrostáticas y superficiales en moléculas polares.

Armstrong propone una clasificación de los solutos en tres categorías (273):

- Solutos enlazantes que presentan coeficientes K_{MW} relativamente elevados ya que tienen gran afinidad por la fase micelar.
- Solutos no enlazantes que no tienen afinidad por la fase micelar, sin ser excluidos de ella ($K_{MW} = 1$).
- Solutos antienlazantes que son excluidos de la fase micelar ($K_{MW} < 1$).

Los solutos enlazantes presentan un factor de capacidad que disminuye a medida que la concentración micelar aumenta.

Los solutos no-enlazantes o antienlazantes presentan factores de retención constantes o aumentan ligeramente con la concentración micelar. En la práctica, es difícil diferenciar entre solutos no-enlazantes o antienlazantes, ya que ambos solutos tienen tiempos de retención muy próximos al volumen muerto.

Los coeficientes de partición K_{SW} y K_{MW} tienen efectos opuestos en la retención. Si K_{SW} aumenta, la retención aumenta, pero si K_{MW} aumenta, la retención disminuye debido al aumento en la partición dentro de la micela.

Cuando la concentración micelar es pequeña el sistema se asemeja a la cromatografía en fase reversa y K_{SW} controla la retención. El efecto sobre la retención es independiente de la concentración micelar ya que la cantidad de tensioactivo adsorbido en la fase estacionaria permanece constante una vez alcanzado el equilibrio micela-monómero.

c) Eficacia en CLM

Si la introducción de un equilibrio secundario tiene un efecto favorable desde el punto de vista termodinámico en la columna, y por tanto en la selectividad, ésta puede tener un efecto desfavorable en la cinética, es decir en la eficacia (anchura de los picos cromatográficos).

La eficacia es el punto débil de la CLM. Es bien conocido que las fases móviles puramente acuosas, mojan mal las fases estacionarias apolares, resultando una transferencia de masas lenta y poco eficaz.

Para mejorar la eficacia de la fase estacionaria, Dorsey (274) adiciona un 3% de n-propanol a la fase móvil micelar. Se ha demostrado que el n-propanol se adsorbe en la fase estacionaria de sílice apolar destruyendo el estado de aglomeración de cadenas alquílicas provocado por el agua, favoreciendo la eficacia. Este alcohol es suficientemente hidrofílico y el 3% v/v es suficiente para no destruir la estructura micelar. En estas condiciones, las eficacias obtenidas con la fase móvil micelar se aproximan a las obtenidas con la fase móvil hidro-orgánica clásica.

Un aumento de la temperatura mejora la transferencia de masas y por tanto la eficacia, pero a temperaturas elevadas, superiores a 100°C, pueden existir problemas de solubilización de la sílice. El empleo de una precolumna sería suficiente para saturar la fase móvil micelar en sílice.

d) Modificación de la fase estacionaria

Una de las propiedades principales de los tensioactivos es la de adsorberse en las superficies. Los tensioactivos, contenidos en la fase móvil micelar, se adsorben en la fase estacionaria en el interior de la columna y modifican sus propiedades iniciales.

Adsorción de tensioactivos en la fase estacionaria

Recientemente se ha presentado un estudio de la adsorción de SDS en cinco columnas diferentes, (275). La figura 16 presenta las isotermas de adsorción del SDS en cinco fases estacionarias distintas .

La adsorción de tensioactivo aumenta bruscamente hasta que se alcanza la CMC, a partir de esta concentración permanece prácticamente constante e igual a $4 \mu \text{ mol/m}^2$ para columnas de fase ligada. Este comportamiento es debido al hecho de que la cantidad de tensioactivo adsorbido está relacionado con la concentración de tensioactivo libre en la fase móvil y esta concentración permanece invariable por encima de la CMC. Se puede observar que la cantidad adsorbida es del mismo orden en las diferentes fases estacionarias.

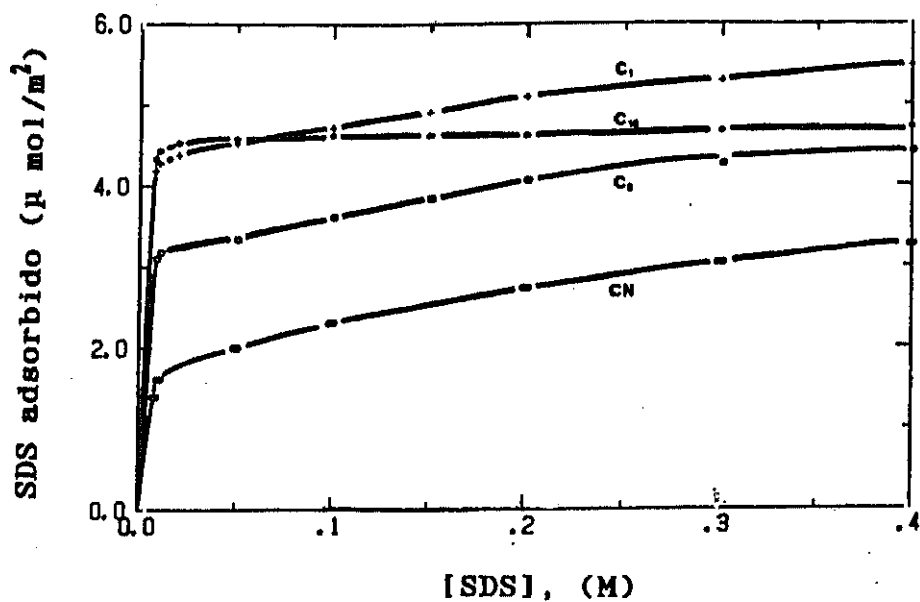


FIGURA 16: Adsorción de SDS en varias fases estacionarias

En el caso de tensioactivos no-iónicos se observa un ligero aumento de la cantidad adsorbida por encima de la CMC.

Los aditivos orgánicos, utilizados para mejorar la eficacia, modifican la adsorción de tensioactivos.

Una importante posibilidad que ofrece la CLM, revelada por las isothermas de adsorción de tensioactivos en la fase estacionaria, es poder trabajar con gradientes de elución sin necesidad de reequilibrar de nuevo la columna. Las ventajas que ofrece la utilización de gradientes en cromatografía son fundamentalmente la reducción de tiempos de análisis y la mejora de los límites de detección para aquellos solutos más retenidos.

Por consiguiente los estudios de las isothermas de adsorción en cromatografía micelar, demuestran que por encima de la CMC la adsorción de tensioactivo es constante, es decir, la superficie de la fase estacionaria es la misma para un valor de concentración de tensioactivo igual a la CMC que a una concentración diez veces superior. Entre dos inyecciones consecutivas con solo efectuar la limpieza de la columna es suficiente, para conseguir resultados reproducibles en ambas inyecciones, por lo que la reducción del tiempo y el menor consumo de disolventes son evidentes (276).

1.5. OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN Y JUSTIFICACIÓN DE ESTE TRABAJO

La contaminación ambiental es debida, bajo el punto de vista químico a la emisión al medio ambiente de compuestos orgánicos e inorgánicos derivados en gran parte de las actividades del hombre, entre los que se encuentran como contaminantes prioritarios los PAHs, estudiados en la presente Memoria.

El control de las emisiones de PAHs al medio ambiente, dadas sus características de riesgo, es un campo que cada vez tiene mayor importancia y desarrollo para proteger al hombre de su influencia nociva, para ello será necesario la identificación y cuantificación de estos compuestos.

Uno de los objetivos de esta Memoria es aprovechar las ventajas que como matrices ofrecen los medios micelares, de mejorar las características analíticas de sensibilidad y selectividad con respecto a las tradicionales, con la finalidad de desarrollar nuevos métodos analíticos sensibles y selectivos para la determinación de PAHs en muestras medio ambientales, teniendo en cuenta los bajos niveles de concentración en que se encuentran estos contaminantes en el medio ambiente.

Con este fin, y en base a la revisión bibliográfica se han elegido las técnicas de fluorimetría y cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorimétrica en medios micelares y medios hidro-orgánicos para su determinación.

En cada uno de los métodos desarrollados se han

evaluado sus características analíticas sensibilidad, selectividad y precisión; estos métodos se han aplicado a la determinación de PAHs en muestras de aire urbano, humo de tabaco y agua potable.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. INSTRUMENTACIÓN

2.1.1. Equipos fluorimétricos

- Espectrofluorímetro Perkin- Elmer MPF-44 A.
- Espectrómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS 30.
- Termostato P-Selecta Frigiterm S-382.
- Patrón de fluorescencia plastificado Perkin- Elmer nº 1 (antraceno 10^{-7} M + naftaleno 6×10^{-7} M) para calibrar la fuente de alimentación.
- Cubetas de cuarzo para fluorescencia de 1.00 cm. de paso óptico y cierre hermético de teflón, Hellma.

2.1.2. Cromatógrafo de líquidos

El sistema se ha montado según se expone en el esquema de la figura 17. Consta de los siguientes elementos:

- Bala de Helio S.E.O.
- Bomba de gradiente Milton Roy CM 4000.
- VÁlvula de inyección con bucle de 20 μ l Rheodyne 7125.
- Baño P-Selecta Precistern
- Detectores fluorimétricos:
 - a) Waters 420 (filtros: excitación 254 nm; emisión 375 nm, *long pass*).
 - b) Perkin-Elmer LS 30.
- Integrador Milton Roy CI 4100

- Columnas cromatográficas:

Nucleosil C18; 5 μm (150X4.6 mm) 100 Å Phenomenex.

Ultremex C1; 3 μm (100X4 mm) Phenomenex.

Hypersil C4; 5 μm (100X4.6 mm) Phenomenex.

Hypersil Green PAH (100X4.6 mm) Shandon.

Ultraspher; 5 μm (125X4 mm) Merck.

- Jeringuilla de 50 μl TP 5050 Unimetrics.

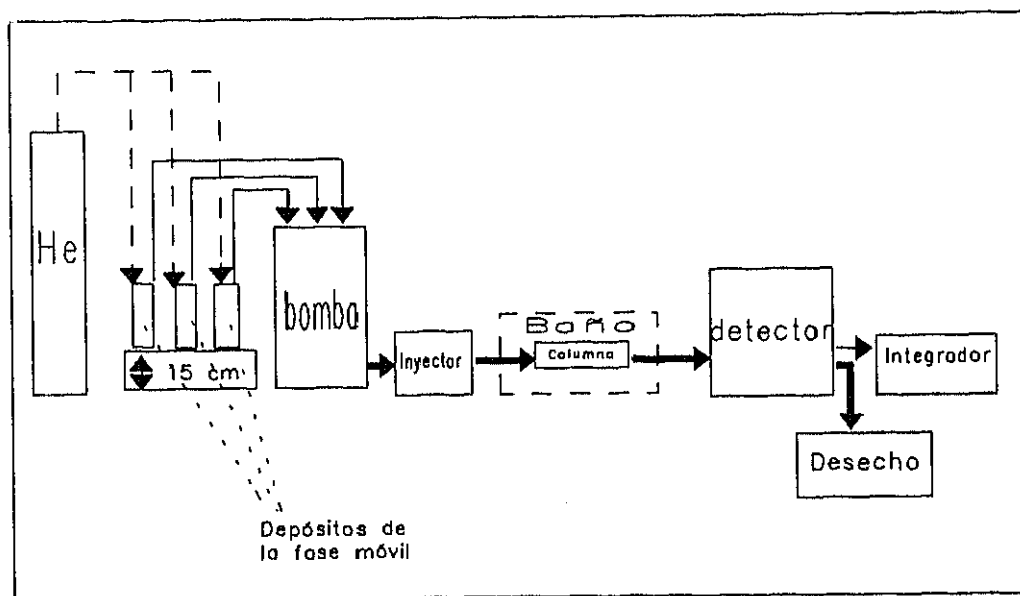


FIGURA 17: Esquema del cromatógrafo

2.1.3. Muestreadores

Aire

- Captador de partículas de alto volumen MCV.
- Filtros de fibra de vidrio Whatman GF/A de 15 cm de diámetro.

Humo de tabaco

- Máquina fumadora SM 302 (ocho canales alineados) Filtrona.
- Filtros de fibra de vidrio de 44 mm de diámetro especiales para este tipo de muestras.

Agua

- Envases de vidrio de color topacio.

2.1.4. Sistemas de extracción

- Soxhlet P-Selecta.
- Baño de ultrasonidos P-Selecta Ultrasons.
- Matraz kitasato (1000 ml), tapón adaptador de goma embudos de separación (100 y 1000 ml) Pobel.

2.1.5. Sistemas de concentración

- Rotavapor Heidolph vv 2000.
- Sistema múltiple Visiprep a vacío de Supelco.

2.1.6. Material auxiliar

Entre el material auxiliar empleado, se puede citar como esencial el siguiente:

- Centrífuga P-Selecta Meditronic de 4800 rpm (3700 g).
- Bomba de vacío Barna-Vacío.
- Balanza analítica digital Sartorius H51, con una precisión de 0.1 mg.
- Sistema de purificación de agua Millipore.
- Lámpara UV para comprobar la disolución y elución de los PAHs.
- Cartuchos de extracción en fase sólida Sep pak Vac C18 6 cc, Sep pak Vac Si 6 cc Waters y Extra sep C18 1000 mg 6cc Phenomenex.
- Filtros de nailon para fase móvil y muestras de 0.45 μ m Lida.
- Micropipetas Brand de 10-50, 20-100, 50-250 y 200-1000 μ l.
- Material de vidrio: matraces de 1, 2, 5, 10, 25, 50, 250, 500 y 1000 ml, vasos de precipitado,... de calidad contrastada Pobel.
- Termómetro, 250 \pm 1 $^{\circ}$ C.
- Programas informáticos: WordPertext 5.1 (tratamiento de textos), Fig-P (Elaboración de gráficos) y

Harvard Graphics V 3.0 (Elaboración de dibujos).

2.2. REACTIVOS

2.2.1. Patrones de PAHs

Acenafteno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(e)pireno, benzo(ghi)perileno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, naftaleno y pireno (Sigma y Serva).

2.2.2. Tensioactivos

Dodecil sulfato de sodio (SDS) (Fluka pureza >97%), pentanosulfonato de sodio (SPS) (Fluka pureza > 98%) y bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) (Serva).

2.2.3. Disolventes

- Metanol y acetonitrilo Carlo Erba de calidad para HPLC.
- Cloruro de metileno, hexano, dietil éter, ciclohexano y acetona de calidad para análisis.

2.2.4. Otros productos químicos

- Agua purificada con el sistema Milli-Q (Millipore).
- Nitrato de sodio (Merck).
- Nitrato de potasio (Merck).
- Sílica gel de 60 mallas (Merck).

2.3. MUESTRAS

2.3.1. Aire urbano de la ciudad de Madrid

Tomado en la Ciudad Universitaria y Paseo del Prado.

M1, M2, M3 y M4, tomadas durante el invierno de 1992.
M5, M6, M7, M8, M9 y M10, tomadas durante el invierno de 1993.

2.3.2. Humo de tabaco rubio y negro

Las muestras de humo de tabaco han sido proporcionadas por D. Joaquín Sarabia López Jefe del departamento de investigación de una empresa privada.

2.3.3. Agua potable (doméstica y de embalse)

Tomada en la Facultad de C. Químicas de la Universidad Complutense de Madrid y en los embalses de la Pinilla (M1), Valmayor (M2) y Picados (M3) de la provincia de Madrid durante el verano de 1993.

2.4. PROCEDIMIENTOS

2.4.1. Estudio fluorimétrico de PAHs

2.4.1.1. Preparación de disoluciones patrones de PAHs y de tensioactivos

Se han preparado las siguientes disoluciones:

- Disoluciones patrones de los 13 PAHs de concentraciones comprendidas entre 1×10^{-3} M (fenantreno) y 1×10^{-4} M (benzo(ghi)perileno), preparadas disolviendo el correspondiente producto sólido en metanol con ayuda de la agitación por ultrasonidos durante 15 a 30 minutos aproximadamente. Las disoluciones una vez preparadas se guardan en frigorífico en frascos topacio.
- Disoluciones acuosas micelares de SPS ($P_m = 192.21$), CTAB ($P_m = 364.5$) y SDS ($P_m = 288.38$). Para ello con ayuda del baño de ultrasonidos se disuelven en agua 2.90 g de SPS, 0.51 g de CTAB y 7.21 g de SDS y se llevan a matraces

aforados de 100, 1000 y 500 ml respectivamente; las concentraciones de las disoluciones resultantes son de 1.5×10^{-1} M de SPS (CMC = 1.1×10^{-1} M), 1.4×10^{-3} M de CTAB (CMC = 8.0×10^{-4} M) y 1.5×10^{-2} M de SDS (CMC = 8.1×10^{-3} M) (277).

2.4.1.2. Registro de los espectros de fluorescencia

A partir de las disoluciones de PAHs obtenidas según el apartado anterior, se toman alícuotas con micropipeta que se llevan a un matraz aforado de 5 ml, enrasando con metanol y se agita en ultrasonido durante un minuto, obteniéndose así una solución intermedia. A partir de esta disolución se toman dos alícuotas iguales, (de manera que la concentración final sea del orden de 3×10^{-7} M.) y se llevan a dos matraces aforados de 5 ml., uno de ellos se enrasa con metanol y el otro con disolución micelar de tensioactivo. Se agitan ambas disoluciones en ultrasonidos durante un tiempo de uno y cinco minutos respectivamente.

A continuación se registran los espectros de excitación y de emisión de los PAHs de las dos disoluciones a las longitudes de onda óptimas de cada uno de ellos. Para el registro de los espectros de excitación se mantiene constante la longitud de onda óptima de emisión y para el registro de los espectros de emisión se fija la longitud de onda óptima de excitación.

2.4.1.3. Influencia del tiempo y la temperatura

Para el estudio de la estabilidad con respecto al tiempo se preparan disoluciones de PAHs en medio acuoso micelar, según el procedimiento anterior y en concentraciones del orden de 3×10^{-7} M; la intensidad de fluorescencia se mide a las longitudes de onda óptimas de excitación y de emisión, a temperatura constante y a intervalos regulares de tiempo hasta las 24 horas.

Para el estudio de la influencia de la temperatura se mide la intensidad de fluorescencia de las disoluciones a igual concentración que las anteriores, en el intervalo de temperaturas comprendido entre 8 y 30°C.

2.4.1.4. Calibrados

Se preparan series de disoluciones patrones de los distintos PAHs, en medio micelar, a diferentes concentraciones, en el intervalo de 0.05 a 188 ng/ml y se agitan en ultrasonidos durante 5 minutos. La intensidad de fluorescencia se mide a las longitudes de onda óptimas de excitación y de emisión de cada uno de los PAHs frente al blanco, que se mide repetidas veces. Así se obtienen las rectas de los calibrados que se ajustan por mínimos cuadrados.

Para el estudio de la precisión del método, se realizan diez medidas en el punto medio del calibrado.

La intensidad de fluorescencia se mide a la

temperatura de 10⁰C.

2.4.1.5. Selectividad

Se mide la intensidad de fluorescencia de los distintos PAHs en solución micelar en concentración igual a la del punto medio del calibrado y en presencia de otros PAHs en relaciones de concentración: PAH/PAH_{interfer.} = 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000.

2.4.1.6. Determinación fluorimétrica de PAHs en aire urbano

2.4.1.6.1. Toma de muestra, extracción y purificación

Las muestras de aire particulado se han tomado en la Ciudad Universitaria y Paseo del Prado de la ciudad de Madrid durante el invierno de 1992. La preparación de las mismas se especifica detalladamente en el apartado 2.4.3.1.

2.4.1.6.2. Evaluación y expresión de los resultados

Para la evaluación de PAHs en el aire particulado se han utilizado los dos métodos siguientes

a) Método de adiciones estándar

A una serie de matraces aforados de 5 ml se les adiciona una alícuota del extracto orgánico procedente de la muestra de aire. A continuación se les añaden, a excepción del primero, volúmenes crecientes de disolución patrón del PAH a determinar, seguidamente se enrasan con la disolución micelar de SDS o CTAB, y se agitan durante 5 min en el baño de ultrasonidos. Esta operación se realiza por triplicado. La intensidad de fluorescencia se mide, a 10°C, a las longitudes de onda óptimas de excitación y de emisión del PAH correspondiente frente al blanco, que se mide repetidas veces.

b) Método de la serie de patrones

En matraz aforado de 5 ml se toma una alícuota del extracto procedente de la muestra de aire urbano y se enrasa con las disoluciones micelares de SDS o CTAB. Para su evaluación se toman como referencia los calibrados que se obtienen según el procedimiento descrito anteriormente.

2.4.2. Estudio de PAHs por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

2.4.2.1. Preparación de disoluciones patrones de PAHs

Para este estudio se utilizan disoluciones

individuales de PAHs obtenidas según se indica en el apartado 2.4.1.1., diluidas convenientemente y disoluciones patrones que contienen la mezcla de los 13 PAHs estudiados. Estas últimas se preparan a partir de las anteriores y en concentraciones del orden de 1×10^{-5} a 1×10^{-6} M. A partir de estas disoluciones y por dilución con metanol se preparan otras a los niveles de concentración deseados.

2.4.2.2. Preparación de la fase móvil

a) Solución micelar de SDS

Se preparan disoluciones acuosas de SDS en concentraciones comprendidas entre 0.05 M y 0.20 M, para ello se disuelve, con ayuda del baño de ultrasonidos, el producto sólido en agua y se lleva a un matraz aforado de 500 ml.

Cuando se utiliza modificador orgánico, se adiciona el volumen deseado de éste.

Estas disoluciones se filtran a vacío utilizando filtros de nailon Lida de $0.45 \mu\text{m}$. Para ello se aplica el vacío suavemente con el fin de que no se forme espuma en el kitasato, ya que sería obstáculo para seguir la filtración del eluyente.

b) Hidro-orgánica

Los eluyentes utilizados, metanol y acetonitrilo se han filtrado con el mismo tipo de filtro de nailon que en el apartado anterior.

Cuando se ha utilizado agua en la fase móvil se ha filtrado igualmente.

2.4.2.3. Puesta a punto del instrumento

Se conectan entre sí todos los elementos del sistema según se expone en el apartado 2.1.2., asegurándose que no hay fuga de eluyentes y que las conexiones eléctricas son correctas. Se espera unos minutos a que se estabilice el equipo, especialmente el detector.

Se colocan los depósitos de la fase móvil a un nivel más elevado que el nivel de la bomba, 15 cm aproximadamente, y se ceba la misma, asegurándose que no queden burbujas de aire en las conducciones utilizadas.

Se purga la bomba en las condiciones iniciales de la fase móvil utilizada y a continuación se programa el gradiente empleado en cada caso.

Se lleva la bomba siempre hasta un flujo de 1 ml/min, excepto en aquel caso que se indique lo contrario, con incrementos de 0.1 ó 0.2 ml/min con el fin de evitar golpes

de presión que podrían perjudicar a la columna cromatográfica.

Cuando se utiliza el detector fluorimétrico LS 30, se programan las parejas de longitudes de onda de excitación y emisión seleccionadas. En aquellos casos que ha sido necesario se han utilizado factores de atenuación a lo largo del programa.

Por otra parte, cuando se utiliza el detector de fluorescencia, Waters 420 (254 nm de excitación y 375 nm de emisión), se comprueba, como es lógico, que se puede llevar la señal del detector a cero, con el fin de eliminar la señal del blanco.

Estos detectores se utilizarán independientemente, dependiendo del método empleado.

Se esperan 15 min como mínimo a que se equilibre la columna cromatográfica con el eluyente y se inyecta una mezcla de patrones, se considera el sistema preparado, cuando no haya cambio significativo en los tiempos de retención.

2.4.2.4. Procedimiento experimental

Tanto las disoluciones patrones como las muestras, se inyectan mediante un bucle de 20 μ l, utilizando la jeringuilla de 50 μ l.

2.4.2.4.1. Cromatografía líquida micelar (CLM)

a) Régimen isocrático

En este estudio se inyectan disoluciones individuales de PAHs en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.1-44 ng/ μ l y mezclas de los PAHs: naftaleno, acenafteno, fenantreno, pireno y criseno, en concentraciones del mismo orden que las anteriores.

El estudio de la separación cromatográfica se lleva a cabo utilizando las fases estacionarias Nucleosil C18, Ultremex C1 e Hypersil C4, fase móvil micelar de SDS a diferentes concentraciones y en presencia de modificador orgánico y caudal 1 ml/min. Para la detección se utiliza el detector fluorimétrico Waters 420 con filtros de 254 nm de excitación y 375 nm de emisión, long pass. Las columnas se termostatan a diferentes temperaturas (20-70°C).

Para efectuar este estudio, se acondiciona previamente la columna, utilizando diferentes gradientes de la fase móvil SDS-modificador orgánico/agua, según la naturaleza de la fase estacionaria, tal como se detalla en el apartado 3.2.1.1. de la presente Memoria.

b) Régimen de gradiente

La determinación de los PAHs por HPLC y detección fluorimétrica se lleva a cabo utilizando como fase estacionaria la columna Nucleosil C18, como fase móvil

gradiente de acetonitrilo/SDS (0.2 M) indicado en la tabla 30 (apartado 3.2.2.2.2.), y caudal de 0.65 ml/min. Para la detección se utiliza el detector fluorimétrico Waters 420 (254 nm de excitación y 375 nm de emisión). La columna se termostata a la temperatura de 22 °C.

Para la obtención de los calibrados se inyectan mezclas patrones de PAHs en dos porciones, por una parte fluoreno y criseno, y por otra los once PAHs restantes. Las concentraciones de las mezclas varían en el intervalo de 0.002-59 ng/μl, obtenidas por diluciones sucesivas hasta donde los límites de detección de los PAHs lo permiten.

Para llevar a cabo este estudio la columna se acondiciona previamente, tal como se especifica en el apartado 3.2.2.2.2. de esta Memoria.

Para comprobar que las columnas estaban acondicionadas, tanto en régimen isocrático como en gradiente, se toma como referencia el tiempo de retención del naftaleno para lo cual se inyecta éste tres veces sucesivas.

2.4.2.4.2. Cromatografía líquida en fase móvil hidro-orgánica

La determinación de los PAHs por HPLC y detección fluorimétrica se lleva a cabo utilizando como fases estacionarias las columnas Hypersil Green PAH y Ultraspher, como fase móvil gradientes de acetonitrilo/agua y caudal de 1 ml/min. Para la detección se utiliza el detector fluorimétrico LS 30 de longitudes de onda variable. Las

columnas se termostatan a la temperatura de 22⁰C.

a) Columna Hypersil Green PAH

La separación de PAHs se lleva a cabo utilizando el gradiente de acetonitrilo/agua indicado en la tabla 36 (apartado 3.2.3.1.1.) y para la detección el programa de parejas de longitudes de onda de excitación/emisión especificado en la tabla 37 del mismo apartado.

Las rectas de calibrados se obtienen inyectando mezclas patrones de los 13 PAHs . Estas mezclas se preparan tomando alícuotas de la disolución patrón de partida y efectuando diluciones sucesivas en el intervalo de concentraciones de 0.014-5.84 ng/ μ l.

b) Columna Ultraspher

Para esta fase estacionara se utiliza el gradiente acetonitrilo/agua indicado en el apartado 3.2.3.2.1. y la detección fluorimétrica se lleva a cabo a las longitudes de onda óptimas de excitación/emisión 295/405 nm, correspondientes al benzo(a)pireno.

2.4.2.5. Evaluación de los cromatogramas

El integrador además de obtener el cromatograma, presenta los resultados en forma de tabla formada por dos

columnas. En la primera, aparecen los tiempos de retención de cada uno de los PAHs y en la segunda, el área de cada uno de los picos cromatográficos, que sirven de base para la identificación (tiempos de retención) y cuantificación de los analitos (áreas de los picos cromatográficos).

2.4.3. Determinación de PAHs por HPLC en aire, humo de tabaco y agua

2.4.3.1. Aire

2.4.3.1.1. Toma de muestra, extracción y purificación

Toma de muestra

Las tomas de muestras se han efectuado en un punto de muestreo situado dentro del casco urbano de la ciudad de Madrid, con un tráfico rodado de 105000 vehículos/día. El captador de aire particulado, MCV, de alto volumen (figura 4, apartado 1.2.1.3.) se encuentra situado en una terraza de un edificio que dista del suelo una altura de 25 m. Las muestras se han tomado durante el período de invierno de 1992 y 1993. El volumen medio de aire recogido fué del orden de 300-800 m³. Los filtros utilizados han sido de fibra de vidrio Whatman GF/A de 15 cm de diámetro previamente calcinados a 450^oC durante 24 h.

Extracción

El aire particulado se ha extraído de los filtros por agitación en baño de ultrasonidos con 50 ml de cloruro de metileno durante 20 minutos y centrifugando posteriormente a 4000 rpm durante 20 minutos. Esta operación se repite dos veces. Unidos los dos extractos se concentran en rotavapor a vacío hasta un volumen del orden de 1 ml.

Purificación o clean-up

Para efectuar esta etapa se ha utilizado gel de sílice previamente tratada en soxhlet con cloruro de metileno durante 6 horas (3 ciclos/hora). A continuación, se activa a 130°C durante 24 horas. Con ayuda del rotavapor y con el fin de homogeneizar la sílice se desactiva ésta con agua hasta un 5% de su peso. Seguidamente se pesan 8 g de gel de sílice y se les añade cloruro de metileno, la mezcla se introduce en una columna de vidrio de 40 cm de longitud y 1 cm de diámetro interno, con precaución de evitar la formación de burbujas en el relleno; para ello se aplican golpes suaves a la columna con una varilla de vidrio. Posteriormente, se eluye el cloruro de metileno durante 1 hora con un caudal de 1 ml/min aproximadamente y, antes de que quede la superficie del relleno al aire libre, se eluye con 40 ml de n-hexano. A continuación se inyecta el extracto, arrastrándolo con 1 ml de cloruro de metileno, y posteriormente se procede a la elución en primer lugar con 25 ml de n-hexano (1ª fracción: hidrocarburos alifáticos) y en segundo lugar con 40 ml de n-hexano/cloruro de metileno (4/1), (v/v), (2ª fracción: hidrocarburos

poliaromáticos).

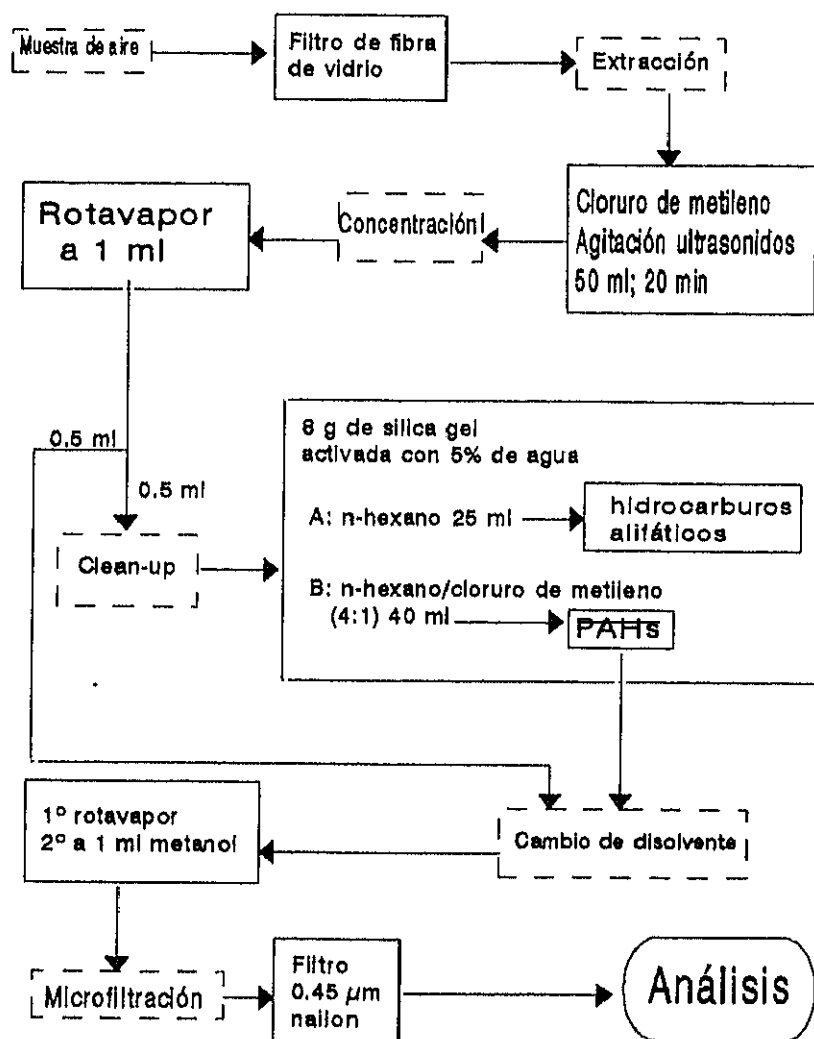
2.4.3.1.2. Procedimiento experimental

El extracto correspondiente a la segunda fracción que contiene los PAHs se concentra en rotavapor a 40°C y finalmente se eliminan las últimas gotas del disolvente bajo corriente de nitrógeno. El residuo se disuelve en 5 ó 10 ml de metanol en matraz aforado, dependiendo del volumen de aire muestreado. Finalmente se filtra la muestra con filtro de nailon Lida, de 0.45 µm de tamaño de poro y se guardan las muestras en frascos topacio bien cerrados con refrigeración a 4°C.

A los extractos que no se les aplica la etapa del clean-up, se les hace directamente el cambio de disolvente con metanol.

Finalmente se aplican los procedimientos especificados en los apartados 2.4.1.6.2., 2.4.2.4.1.b. ó 2.4.2.4.2.a., según el método que se aplique, para la cuantificación de los PAHs.

El proceso seguido desde la toma de muestra hasta la obtención de la fracción de PAHs se esquematiza a continuación:



Esquema de preparación de la muestra de aire particulado

2.4.3.2. Humo de tabaco

2.4.3.2.1. Toma de muestra, extracción y purificación

Toma de muestra

Para la toma de muestras de humo de tabaco se ha utilizado la máquina fumadora de ocho canales, indicada en la figura 5 del apartado 1.2.1.3. Dicha máquina opera bajo unas condiciones controladas y establecidas según la Norma ISO 3308 (99).

Para la captación de las partículas del humo de tabaco se han utilizado filtros de fibra de vidrio también normalizados para este tipo de muestras. La cantidad de humo retenido en cada filtro es la correspondiente a 5 cigarrillos.

Por otra parte, los cigarrillos que se analizan poseen un grado de humedad del $60 \pm 5\%$ y temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Extracción

El proceso de extracción se lleva a cabo en baño de ultrasonidos, utilizando 10 ml de ciclohexano, durante 30 minutos. Del extracto se toman 2 ml para su purificación.

Purificación

Para llevar a cabo este proceso se utilizan cartuchos Sep pak Vac Si. En primer lugar se acondiciona el cartucho pasando a través de su lecho 15 ml de ciclohexano, utilizando para ello el sistema visiprep, posteriormente se introducen los 2 ml del extracto en el cartucho y se elimina el disolvente bajo una ligera corriente de aire, hasta sequedad total del cartucho.

Posteriormente se eluye el compuesto de interés con 2 ml de cloruro de metileno.

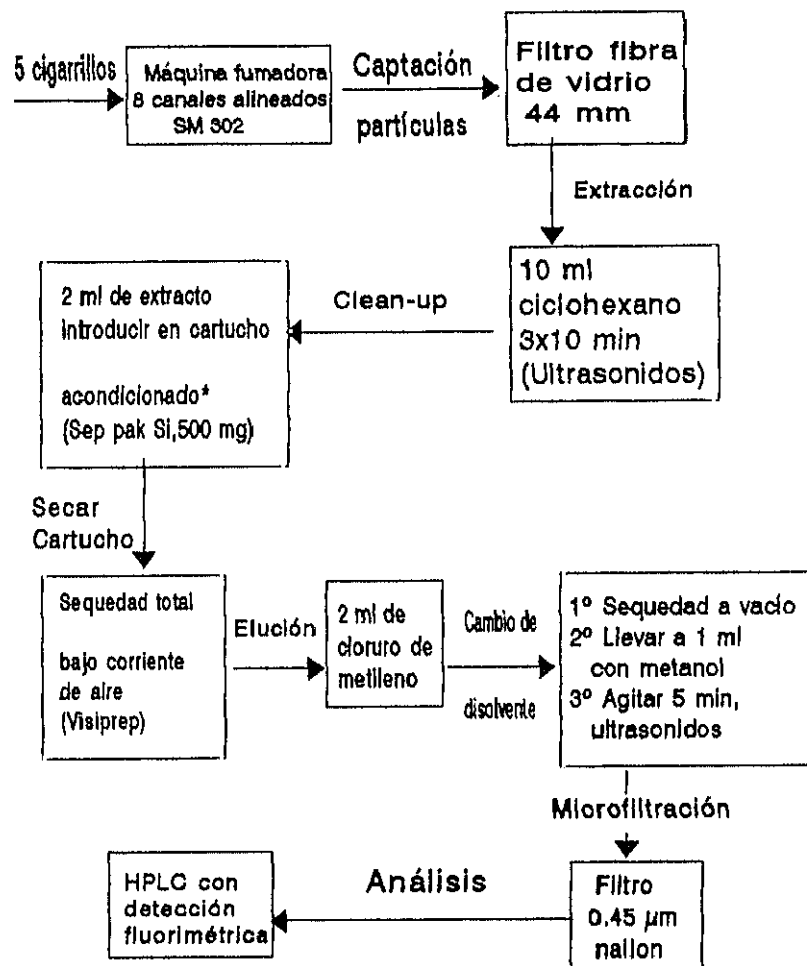
2.4.3.2.2. Procedimiento experimental

Una vez eluída la muestra, se deja evaporar bajo una ligera corriente de aire hasta sequedad. A continuación se disuelve el residuo con 1 ml de metanol y se agita en baño de ultrasonidos durante 5 minutos.

Para proteger la columna analítica, el extracto recogido se filtra antes de su inyección en unidades de microfiltración de nailon de 0.45 μm .

Finalmente se aplica el procedimiento descrito en el apartado 2.4.2.4.2.b. utilizando la columna Ultraspher para la separación y cuantificación de benzo(a)pireno.

A continuación se presenta un esquema del proceso global seguido:



* 15 ml de ciclohexano

Esquema de la preparación de la muestra del humo de tabaco

2.4.3.3. Agua

2.4.3.3.1. Toma de muestra, preconcentración y extracción

Toma de muestra

Se han tomado muestras de agua potable, doméstica y de embalse, de la provincia de Madrid durante el verano de 1993. Tanto el agua de grifo como la de embalse se han tomado directamente en frascos topacio. Estos frascos se aclaran previamente con el disolvente que se utiliza como eluyente de los PAHs en HPLC, que en este caso concreto, es acetonitrilo.

Las muestras de agua se han tomado en esta Facultad durante el mes de junio y las de los embalses de La Pinilla, Valmayor y Picados, durante los meses de junio, julio y septiembre respectivamente. Estas muestras se han depositado en frigorífico a 4°C para su posterior análisis.

Para la extracción y preconcentración de las muestras se utilizan cartuchos Sep pak Vac μ C18; éstos requieren un acondicionamiento previo para activar el empaquetamiento antes de la preconcentración de la muestra.

El acondicionamiento de los cartuchos consiste en pasar dos veces sucesivas 6 ml de metanol y seguidamente otras dos veces 6 ml de agua Milli Q.

El sistema de preconcentración (figura 18) permite una

rápida y cómoda extracción de diferentes volúmenes de muestra. Un embudo de separación se coloca como reserva de muestra sobre otro embudo más pequeño, que está conectado al cartucho en su extremo abierto. De esta forma el manejo de la muestra es mínimo y el procedimiento se hace más cómodo y seguro.

El volumen de muestra de agua, 1500 ml, se pasa a través del cartucho inmediatamente después de su acondicionamiento.

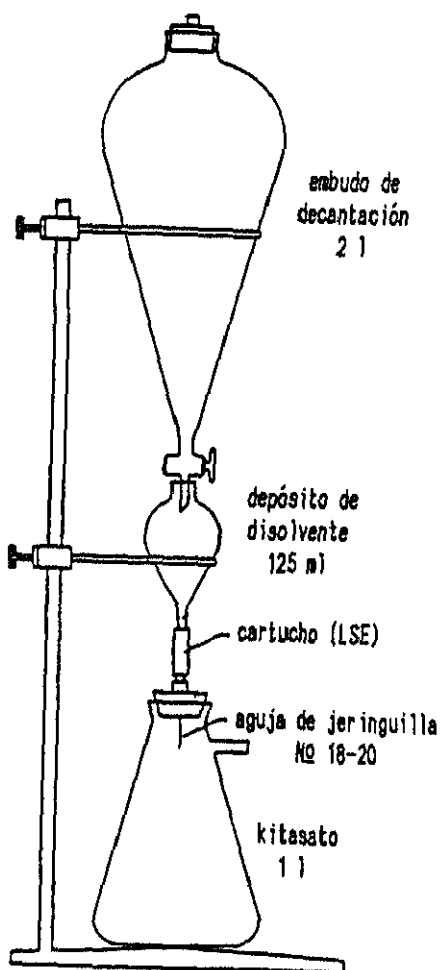


FIGURA 18: Sistema de preconcentración

A continuación, el cartucho que ha retenido los compuestos de interés, los PAHs, se coloca en el sistema Visiprep. Se seca con una corriente de aire suministrada por la bomba de vacío a una presión de -7 in Hg durante 5 min. Seguidamente se centrifuga durante 5 min a 2000 rpm. Posteriormente los PAHs retenidos se eluyen con dos porciones de dietil eter, la primera 3 ml y la segunda, 1 ml. Las dos porciones se recogen conjuntamente en un tubo de extracción graduado.

2.4.3.3.2. Procedimiento experimental

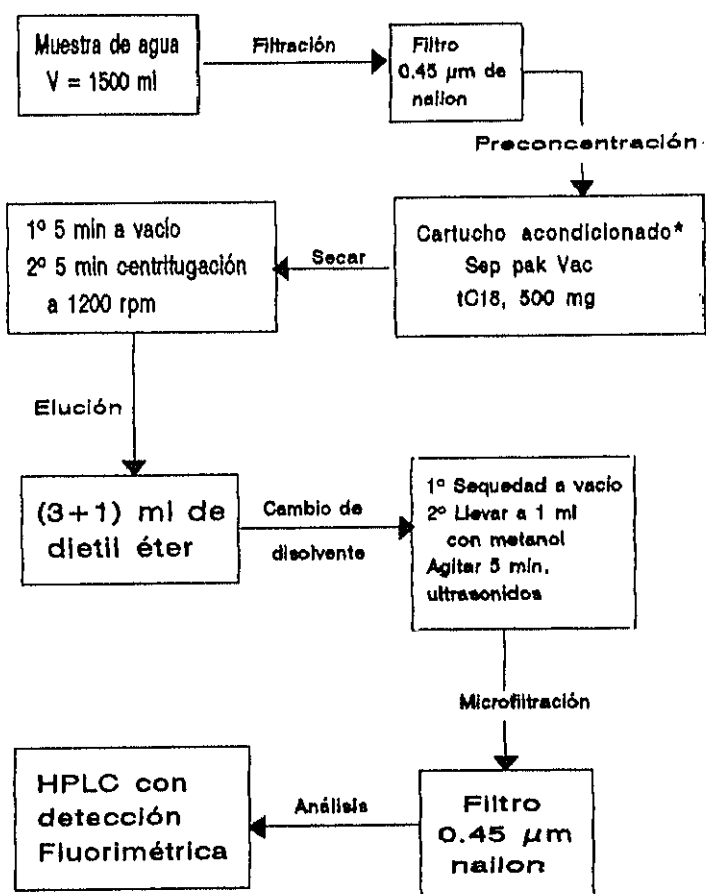
La muestra así eluída se deja evaporar bajo una ligera corriente de aire, aproximadamente en un tiempo de 8 minutos. Durante esta evaporación el tubo de extracción se introduce en un vaso que contiene agua a la temperatura $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

En estas condiciones de trabajo siempre queda una pequeñísima cantidad de agua, del orden de 50 μl (1 gota) que no afecta a la determinación. Este residuo se lleva a 1 ml con metanol, y se agita en baño de ultrasonidos durante 5 min.

Con el fin de proteger la columna analítica, el extracto recogido se filtra previamente a su inyección en unidades de microfiltración de nailon de 0.45 μm .

Finalmente se aplica el procedimiento descrito en el apartado 2.4.2.4.2.a. para la separación y cuantificación de los PAHs.

A continuación se presenta un esquema del procedimiento realizado para la preparación y determinación de la muestra de agua:



 * Acondicionamiento:
 1º 2x6 ml metanol
 2º 2x6 ml agua Milli-Q

Esquema de determinación de PAHs en muestras de agua

2.4.3.4. Evaluación y expresión de los resultados

La identificación de los PAHs en las muestras reales se lleva a cabo tomando como base los tiempos de retención de los diferentes PAHs. Para su cuantificación se toman como referencia las áreas de los picos cromatográficos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. ESTUDIO FLUORIMÉTRICO DE PAHs EN SOLUCIONES MICELARES DE TENSIOSACTIVOS IÓNICOS

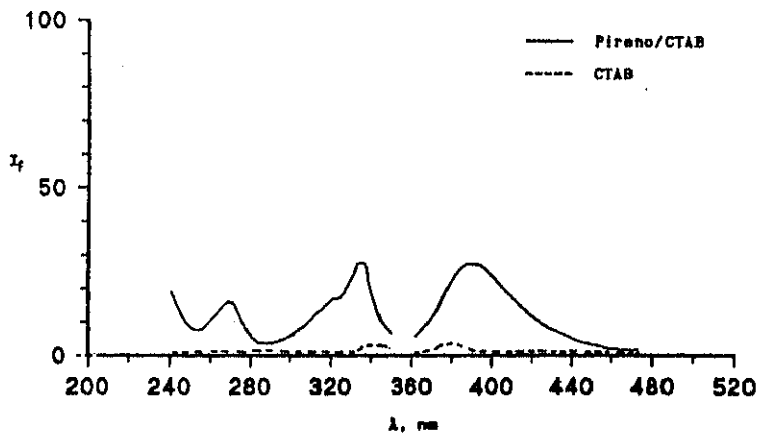
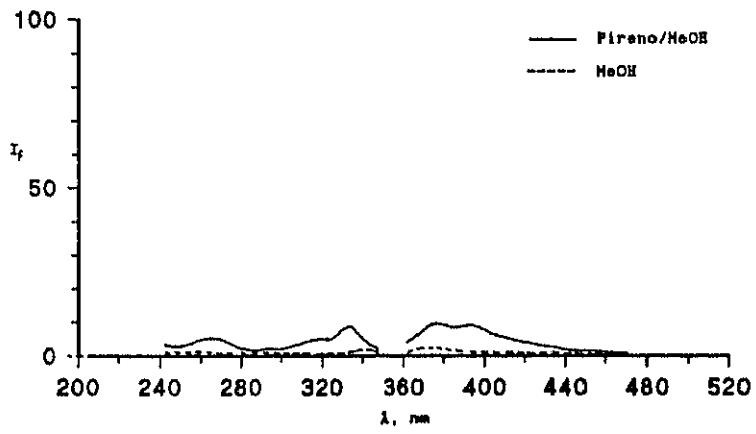
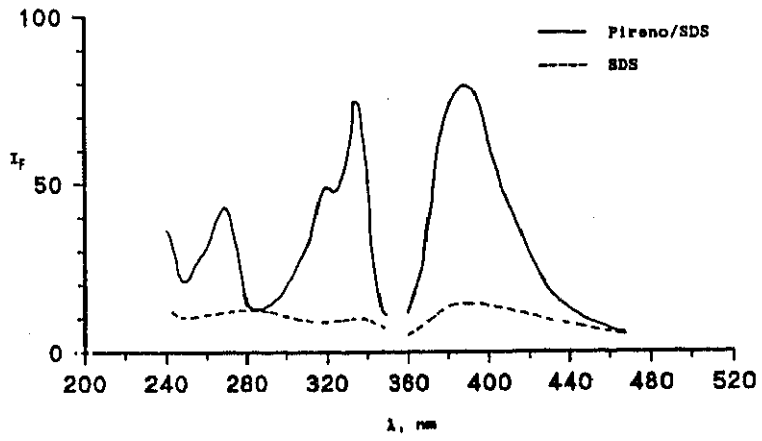
Teniendo en cuenta la importancia que tienen los PAHs desde el punto de vista de su toxicidad, se hace necesario el poner a punto nuevos métodos analíticos que ofrezcan mayores ventajas frente a los ya existentes. Debido a esto y teniendo en cuenta las ventajas que ofrecen las soluciones micelares desde el punto de vista analítico, a continuación se presenta un estudio fluorimétrico en solución micelar con vistas a proponer nuevos métodos de determinación de PAHs sensibles y selectivos.

3.1.1. Espectros de fluorescencia de los PAHs en soluciones individuales de tensioactivos iónicos: SPS, SDS y CTAB

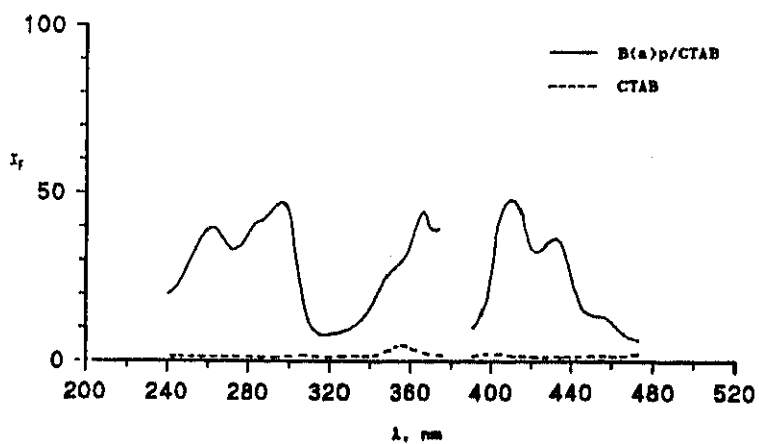
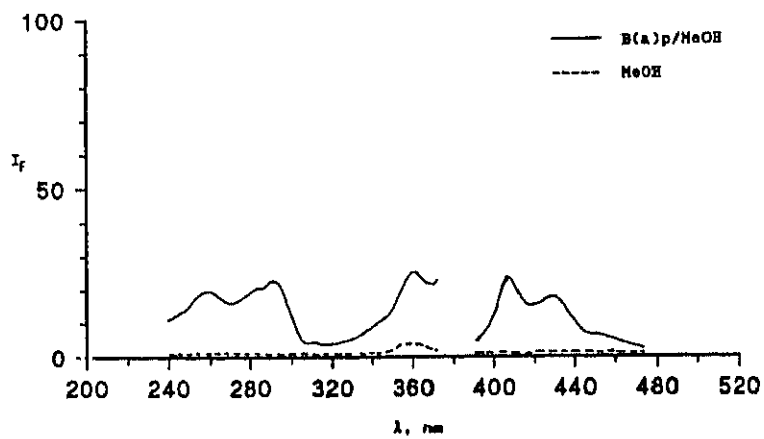
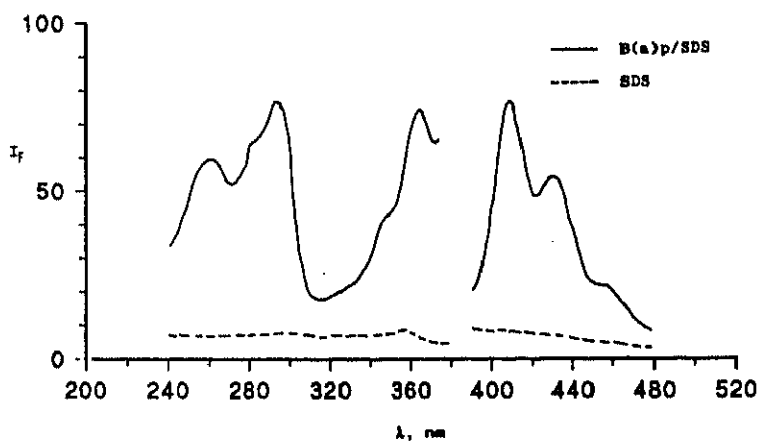
Con el fin de determinar las longitudes de onda óptimas de excitación y emisión de las disoluciones individuales de los PAHs, en soluciones micelares de pentano sulfonato de sodio (SPS), dodecil sulfato de sodio (SDS) y bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) se han registrado los espectros de fluorescencia, procediendo de la forma indicada en el apartado 2.4.1.2.

Dado que de los dos tensioactivos aniónicos ensayados, el SDS ofrece mejores resultados, a continuación se presentan los espectros de excitación y emisión de cada uno de los PAHs pireno, benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno y benzo(ghi)perileno en los medios de SDS y CTAB. También se incluyen los obtenidos en metanol con fines comparativos.

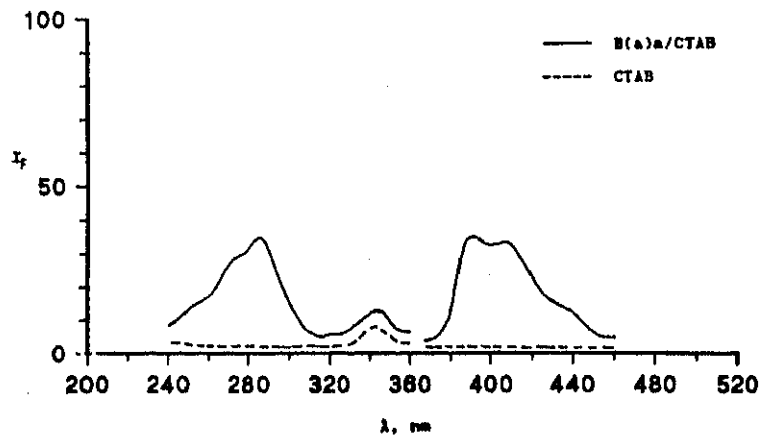
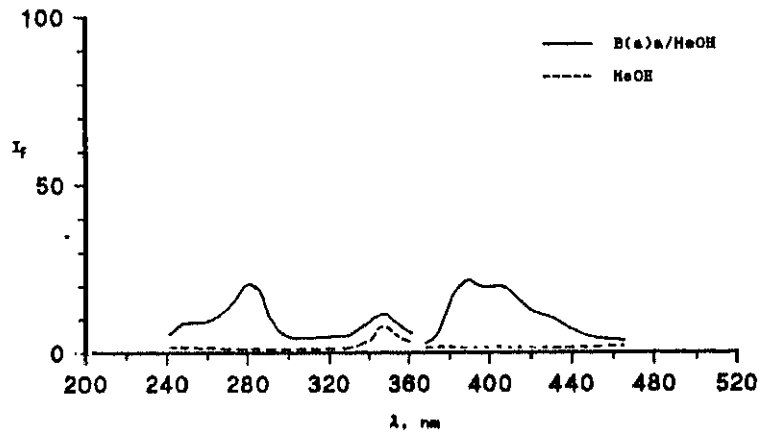
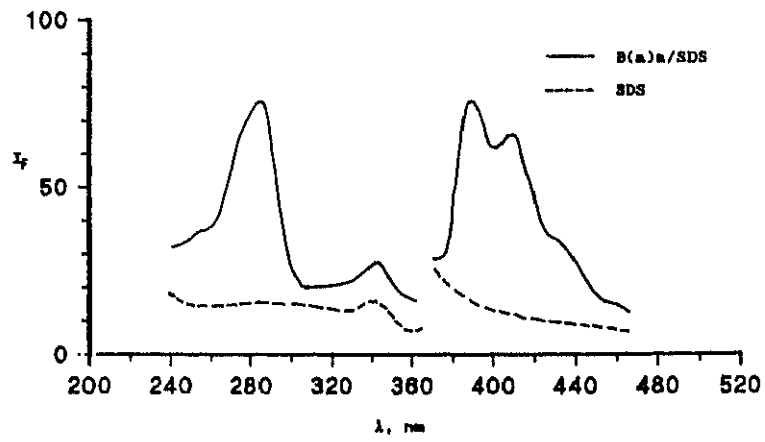
1- Espectros del pireno



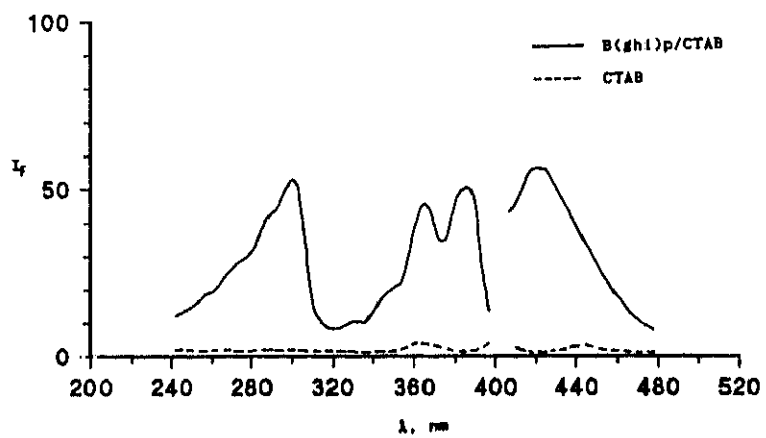
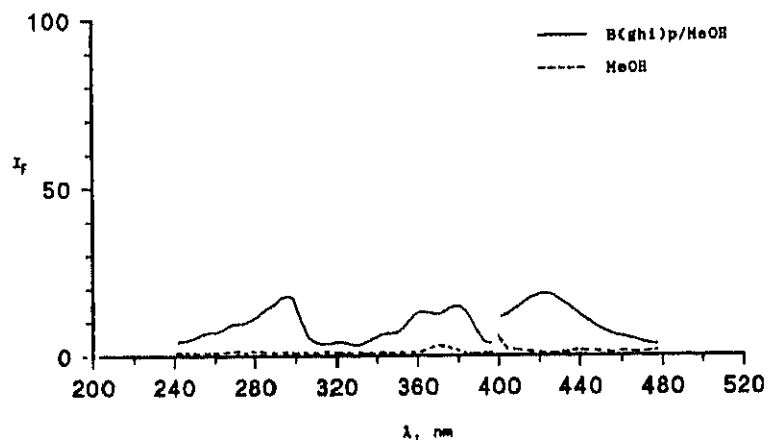
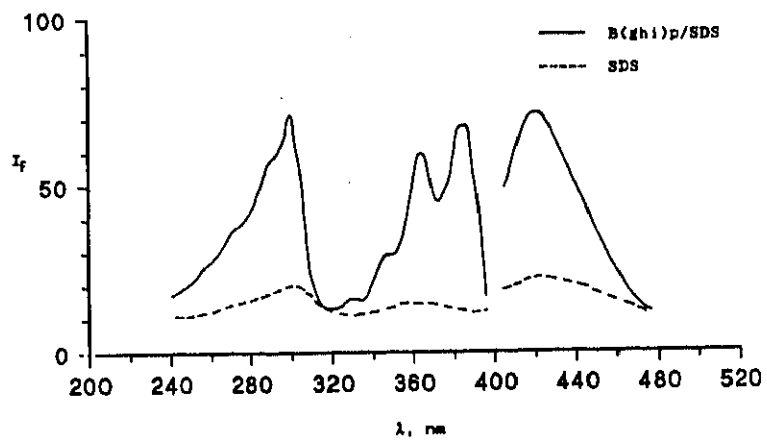
2- Espectros del benzo(a)pireno, B(a)p



3- Espectros del benzo(a)antraceno, B(a)a



4- Espectros del benzo(ghi)perileno, B(ghi)p



Se han seleccionado estos PAHs por ser los más abundantes en el medio ambiente y además porque las intensidades de fluorescencia de estos compuestos se ven incrementadas notablemente en estos medios micelares.

En la tabla 9 se resumen las longitudes de onda óptimas de cada uno de los PAHs en los cuatro medios estudiados.

En ella puede observarse en general, que las longitudes de onda óptimas de excitación y emisión de los PAHs en SDS y CTAB no experimentan desplazamientos significativos con respecto a las que presentan en metanol. En medio micelar de SDS cabe destacar el benzo(e)pireno que experimenta un desplazamiento de la longitud de onda de excitación de 40 nm hacia la región visible. En solución micelar de SPS se observan desplazamientos del orden de 50 nm, de las longitudes de onda de emisión hacia el visible del benzo(ghi)perileno, benzo(e)pireno y criseno así como del fluoranteno hacia el ultravioleta, y de 40 nm hacia el visible, de la longitud de onda de excitación del benzo(e)pireno.

TABLA 9

Longitudes de onda óptimas de excitación/emisión de los PAHs

Nº	PAHs	$\lambda_{ex} / \lambda_{em}$, nm			
		PAH-SDS	PAH-CTAB	PAH-SPS	PAH-MeOH
1	Pireno	335/386	335/386	336/390	335/376
2	B(a)a	288/388	284/390	285/398	287/388
3	B(ghi)p	300/420	290/420	305/472	300/420
4	Fenantreno	250/365	250/367	250/366	250/365
5	B(e)p	330/390	290/391	330/440	290/390
6	B(a)p	294/405	298/408	290/408	295/405
7	Acenafteno	290/325	290/323	290/324	290/325
8	Naftaleno	280/325	292/325	280/324	280/325
9	Criseno	270/365	270/382	270/408	265/365
10	Fluoranteno	285/465	287/470	290/408	285/465
11	Fluoreno	260/306	260/305	260/301	260/306
12	Db(ah)a	290/400	290/398	290/410	290/395
13	Antraceno	377/404	360/405	358/404	356/402

3.1.2. Factores de sensibilización de los PAHs en estos medios

Se definen como la relación entre la intensidad de fluorescencia del PAH en solución micelar a sus longitudes de onda óptimas y la intensidad de fluorescencia del PAH en metanol a sus longitudes de onda óptimas I_{SPS}/I_{MeOH} , I_{SDS}/I_{MeOH} y I_{CTAB}/I_{MeOH} .

En la tabla 10 se indican los factores de sensibilización de los distintos PAHs en soluciones micelares de SPS, SDS y CTAB.

Tabla 10
Factores de sensibilización de los PAHs en soluciones micelares de SPS, SDS y CTAB.

PAHs	I_{SPS}/I_{MeOH}	I_{SDS}/I_{MeOH}	I_{CTAB}/I_{MeOH}
Pireno	2.3	8.6	3.1
B(a)a	1.0	3.3	1.7
B(ghi)p	1.7	3.0	3.3
Fenantreno	4.4	3.0	1.5
B(e)p	2.3	2.6	1.6
B(a)p	1.3	2.5	1.7
Acenafteno	3.0	2.4	2.0
Naftaleno	0.4	2.1	1.7
Criseno	1.0	2.1	0.8
Fluoranteno	2.1	1.4	0.3
Fluoreno	1.2	1.3	1.0
Db(ah)a	0.8	1.1	0.8
Antraceno	0.9	1.1	0.2

En medio micelar de pentano sulfonato de sodio ocho PAHs presentan factores de sensibilización superiores a 1 siendo el fenantreno el que presenta mayor factor e igual a 4.4. El dibenzo(a,h)antraceno, antraceno y naftaleno lo presentan inferior a uno. Este hecho hace suponer, que estos hidrocarburos interferirán en menor cuantía en la determinación fluorimétrica de los restantes PAHs en este medio.

Por otra parte, se deduce que el empleo del medio micelar de SDS puede proporcionar un método más sensible y selectivo para la determinación de la mayoría de los PAHs con respecto al metanol, pues presentan factores de sensibilización superiores a 1 once PAHs de los trece estudiados. Destaca especialmente el caso del pireno que presenta el máximo factor de sensibilización, igual a 8.6.

En solución micelar de CTAB, el B(ghi)p es el PAH que presenta mayor factor de sensibilización, igual a 3.3 por lo que el empleo del medio micelar de CTAB podrá proporcionar un método bastante más sensible y selectivo para su determinación que en medio metanol.

Los factores de sensibilización inferiores a 1 pueden atribuirse a diversas causas entre las que pueden citarse procesos de conversión interna y procesos de transferencia de energía.

Si se comparan los factores de sensibilización de los PAHs en los medios aniónicos, es evidente que se obtienen mejores factores de sensibilización en medio micelar de SDS. Debido a esta cualidad, el resto del estudio se

realiza en soluciones micelares de SDS y CTAB.

Cabe indicar que el estudio de la selectividad en la determinación fluorimétrica de PAHs, como se verá posteriormente, está basado en estos resultados.

3.1.3. Influencia del tiempo en la estabilidad de las disoluciones analíticas.

Para efectuar este estudio se ha seguido el procedimiento 2.4.1.3. descrito en la parte experimental. En general, tal como queda reflejado en la tabla 11, las disoluciones son estables al menos durante 24 horas; en solución micelar de SDS no se aprecian cambios significativos en la emisión de fluorescencia en el intervalo de tiempo estudiado a excepción del pireno y fenantreno en que se produce una disminución de la señal de fluorescencia del 14 y 5% respectivamente.

En solución micelar de CTAB se producen disminuciones apreciables en la intensidad de fluorescencia del acenafteno, fluoranteno y antraceno siendo éstas de 35, 18 y 15% respectivamente.

Por consiguiente teniendo en cuenta este estudio, una vez preparadas las disoluciones, las medidas de fluorescencia se efectúan durante la primera hora.

Tabla 11

Influencia del tiempo en la estabilidad de las disoluciones.

PAH	- ΔI , (%); (0 - 24) h	
	PAH-SDS	PAH-CTAB
Pireno	14	-
B(a)a	-	-
B(ghi)p	-	-
Fenantreno	5	-
B(e)p	-	-
B(a)p	-	-
Acenafteno	-	35
Naftaleno	-	-
Criseno	-	-
Fluoranteno	-	18
Fluoreno	-	-
Db(ah)a	-	-
Antraceno	-	15

3.1.4. Optimización de la temperatura de medida.

Como es sabido la temperatura puede influir notablemente en la emisión de fluorescencia por lo que se ha procedido a su optimización. Para ello se ha efectuado este estudio siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.4.1.3., en el intervalo de temperatura de 10 a 30°C.

El efecto de la temperatura sobre la intensidad de emisión de fluorescencia se muestra en la tabla 12. Como era de esperar la intensidad de fluorescencia disminuye conforme aumenta la temperatura debido a un mayor grado de competencia entre la emisión de fluorescencia y los procesos no radiacionales que tienen lugar a elevadas temperaturas.

3

Tabla 12

Influencia de la temperatura en la intensidad de fluorescencia.

PAH	- ΔI_f , (%); (10 - 30) ^o C	
	PAH-SDS	PAH-CTAB
Pireno	29.2	28.4
B(a)a	10.8	9.1
B(ghi)p	12.0	18.6
fenantreno	15.1	-
B(e)p	16.3	6.7
B(a)p	13.2	13.3
Acenafteno	12.6	-
Naftaleno	4.2	-
Criseno	10.2	11.2
Fluoreno	-	7.8
Db(ah)a	-	8.8
Antraceno	9.2	-

El caso más notorio es el pireno, que disminuye un 29.2% y 28.4% su intensidad de fluorescencia en los medios de SDS y CTAB respectivamente. La variación de la intensidad de fluorescencia del pireno en medio de SDS con la temperatura queda reflejada en la figura 19. Este efecto es crítico para este PAH ya que es el que presenta mayor factor de sensibilización.

Debido a esta característica, en los estudios posteriores se termostatan las disoluciones analíticas a la temperatura de 10°C.

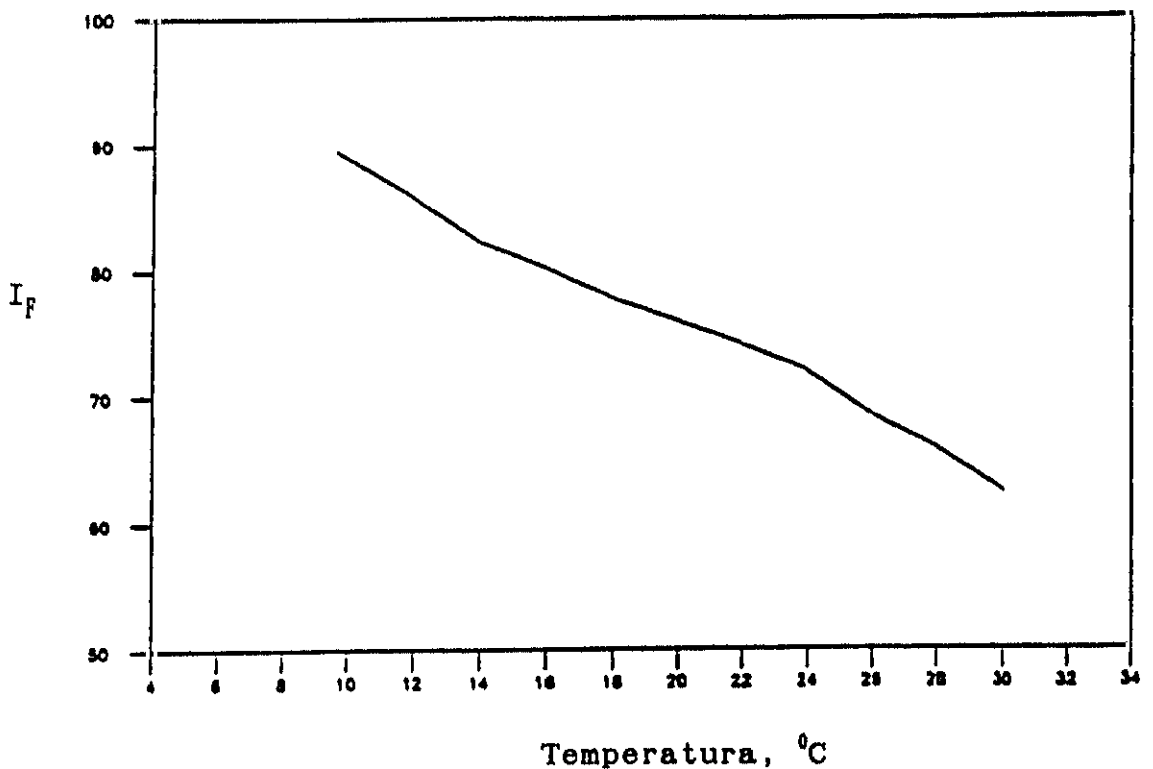


FIGURA 19: Influencia de la temperatura en la intensidad de fluorescencia del pireno en medio SDS.

3.1.5. Características analíticas en los medios micelares de SDS y CTAB

Para poder determinar la cantidad de PAHs que contiene una muestra, es necesario conocer la relación que existe entre la concentración de aquellos y la medida que se realiza, en este caso la intensidad de fluorescencia, esa relación la dan los calibrados. Por otra parte también es importante conocer las características analíticas del método, es decir, precisión, sensibilidad, -expresada por la pendiente de los calibrado y los límites detección y determinación- y selectividad.

3.1.5.1. Calibrados

Para la obtención de las rectas de calibrado se ha llevado a cabo el procedimiento descrito en el apartado 2.4.1.4. de la parte experimental.

En solución micelar de CTAB solo se han considerado aquellos PAHs cuyos factores de sensibilización son superiores a 1.

Los límites superiores de linealidad se resumen en la tabla 13. Estos, corresponden al intervalo de linealidad estudiado, siendo su amplitud inversamente proporcional a la sensibilidad de cada uno de los PAHs, teniendo en cuenta que para la obtención de los calibrados se han fijado valores máximos de las intensidades de fluorescencia del orden de 100 unidades.

TABLA 13

Limites superiores de linealidad estudiados

PAH	PAH-SDS, ng ml ⁻¹	PAH-CTAB, ng ml ⁻¹
Pireno	0.20	12
B(a)a	0.46	28
B(ghi)p	2.74	7.4
Fenantreno	17.8	13
B(e)p	6.4	25
B(a)p	0.38	2.3
Acenafteno	22	15
Naftaleno	12.8	188
Criseno	1.4	-
Fluoranteno	20.2	-
Fluoreno	2.55	-
Db(ah)a	2.78	-
Antraceno	17.8	-

En la tabla 14 se muestran las pendientes, m, de los calibrados. Como puede observarse, se obtiene mayor sensibilidad en medio micelar de SDS, tal y como queda reflejado en los valores de las pendientes de las rectas

de calibrado, siendo éstas del orden de 10^9 a 10^{11} M^{-1} , con coeficientes de correlación en general de 0.999.

Tabla 14

Pendientes de las rectas de calibrado de los PAHs en SDS y CTAB.

PAH	PAH-SDS		PAH-CTAB	
	$m \times 10^9,$ M^{-1}	Coef. corr.	$m \times 10^9,$ M^{-1}	Coef. corr.
Pireno	97	0.999	1.4	0.998
B(a)a	51	0.999	0.65	0.997
B(ghi)p	9.8	0.998	4.1	0.999
Fenantreno	0.34	0.999	1.2	0.996
B(e)p	3.3	0.997	0.97	0.993
B(a)p	660	0.999	9.3	0.998
Acenafteno	1.8	0.999	0.85	0.999
Naftaleno	0.96	0.995	0.06	0.999
Criseno	11	0.999	-	-
Fluoranteno	0.14	0.999	-	-
Fluoreno	6.0	0.999	-	-
Db(ah)a	5.5	0.999	-	-
Antraceno	0.2	0.999	-	-

m: Pendiente del calibrado

3.1.5.2. Precisión

La precisión se ha determinado realizando diez medidas al nivel de concentración correspondiente al punto medio del calibrado.

Para este estudio se procedió al cálculo de los parámetros estadísticos que a continuación se indican:

- Valor medio: \bar{x}
- Desviación estándar: s
- Desviación estándar relativa:

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

Los resultados obtenidos figuran en las tablas 15 y 16.

La precisión en la determinación de todos los PAHs es inferior al 5% en los dos medios micelares utilizados, a excepción del fenantreno en SDS y benzo(e)pireno en CTAB que presentan una desviación estándar relativa del 5.8% y 5.4% respectivamente.

Tabla 15

Precisión en la determinación de PAHs en medio micelar de SDS.

PAH	c, ng ml ⁻¹	\bar{x} , ng ml ⁻¹	s, ng ml ⁻¹ x 10 ⁻³	s _r , %
Pireno	0.121	0.129	4.6	3.6
B(a)a	0.228	0.235	8.9	3.8
B(ghi)p	1.38	1.38	30.4	2.2
Fenantreno	0.891	0.873	50.6	5.8
B(e)p	4.80	4.85	38.8	0.8
B(a)p	0.177	0.174	7.8	4.5
Acenafteno	13.6	13.6	27.2	0.2
Naftaleno	6.41	6.45	213	3.3
Criseno	1.01	1.02	17.3	1.7
Fluoranteno	10.1	9.71	20.4	2.1
Fluoreno	1.91	2.09	85.7	4.1
Db(ah)a	1.39	1.40	16.8	1.2
Antraceno	0.891	0.904	13.6	1.5

c: Concentración en el punto medio del calibrado, n = 10

Tabla 16

Precisión en la determinación de PAHs en el medio micelar de CTAB.

PAH	c, ng ml ⁻¹	\bar{x} , ng ml ⁻¹	s, ng ml ⁻¹	s _r , %
Pireno	6.39	6.24	0.15	2.4
B(a)a	15.1	15.1	0.68	4.5
B(ghi)p	3.78	3.77	0.15	4.0
Fenantreno	5.40	5.41	0.24	4.5
B(e)p	13.3	13.7	0.74	5.4
B(a)p	1.13	1.14	0.047	4.1
Acenafteno	9.09	9.04	0.14	1.5
Naftaleno	106	104	2.3	2.2

c: Concentración en el punto medio del calibrado, n = 10

3.1.5.3. Límites de detección y de determinación

El límite de detección, LD, se define como la cantidad más pequeña que puede apreciarse diferenciándose estadísticamente del blanco (278). Para calcularlo se

aplica la siguiente expresión:

$$LD = K \frac{s_b}{m}$$

siendo: $K = 3$

s_b desviación estándar del blanco
 m pendiente de la recta de calibrado.

El límite de determinación o cuantificación, LQ, es la concentración más baja que puede ser determinada cuantitativamente, para un determinado nivel de significación (278). Suele utilizarse para indicar el límite inferior del intervalo lineal del calibrado. Puede calcularse mediante la expresión:

$$LQ = K \frac{s_b}{m}$$

siendo: $K = 10$

Aplicando estas expresiones a los resultados obtenidos en el apartado 3.1.5.1. se obtienen los resultados de la tabla 17.

Tabla 17

Límites de detección y de determinación de PAHs en medio micelar de SDS y CTAB

PAH	PAH-SDS		PAH-CTAB	
	LD ng ml ⁻¹	LQ ng ml ⁻¹	LD ng ml ⁻¹	LQ ng ml ⁻¹
Pireno	0.003	0.01	0.17	0.57
B(a)a	0.01	0.03	0.13	0.43
B(ghi)p	0.05	0.17	0.08	0.27
Fenantreno	0.13	0.43	0.02	0.07
B(e)p	0.03	0.11	0.31	1.0
B(a)p	0.002	0.007	0.10	0.33
Acenafteno	0.04	0.13	0.24	0.80
Naftaleno	0.2	0.67	1.6	5.3
Criseno	0.01	0.03	-	-
Fluoranteno	0.38	1.27	-	-
Fluoreno	0.01	0.03	-	-
Db(ah)a	0.04	0.13	-	-
Antraceno	0.4	1.33	-	-

Los límites de detección son particularmente bajos, al nivel de ppt. Así, el del pireno es de 0.003 ng ml^{-1} y el del benzo(a)pireno de 0.002 ng ml^{-1} en solución micelar de SDS, siendo estos 56 y 50 veces inferiores respectivamente, a los obtenidos en medio micelar de CTAB. Cabe también destacar los bajos límites de detección del benzo(ghi)perileno y fenantreno en solución micelar de CTAB siendo éstos de 0.08 y 0.02 ng ml^{-1} respectivamente.

3.1.5.4. Selectividad.

El estudio de la selectividad se realiza observando el efecto que sobre la intensidad de fluorescencia de un PAH ejerce la presencia de otros.

Para ello las disoluciones se preparan según el procedimiento 2.4.1.5. descrito en la parte experimental.

Para decidir si la especie añadida presenta o no interferencia, se utiliza el criterio de Kirkbright (278) por el cual se consideran interferentes aquellas especies que producen diferencias en la intensidad de fluorescencia superiores a $\pm 2s$.

Los PAHs seleccionados para este estudio han sido el pireno y benzo(a)pireno en los dos medios micelares, benzo(a)antraceno en solución micelar de SDS y benzo(ghi)perileno en CTAB. El pireno, benzo(a)antraceno y benzo(ghi)perileno se estudian por sus altos factores de sensibilización, al mismo tiempo que están considerados como los PAHs más abundantes en el medio ambiente y el

benzo(a)pireno por ser el más cancerígeno y mutágeno de los PAHs en estudio y además indicador de la contaminación doméstica e industrial.

El estudio de la selectividad se resume a continuación en términos de errores relativos.

Los signos (+) y (-) indican la existencia o no de interferencia.

3.1.5.4.1. Determinación de pireno, benzo(a)pireno y benzo(a)antraceno en solución micelar de SDS.

En las tablas 18, 19 y 20 se resumen los estudios de las interferencias en la determinación de los PAHs en medio micelar de SDS.

Se observan resultados particularmente notables para la determinación del pireno, que puede llevarse a cabo en presencia de acenafteno y fluoreno en relaciones PAH/analito = 1000/1, siendo los errores cometidos en la determinación del 1.2% en los dos casos.

Tabla 18

Interferencias en la determinación de pireno en solución micelar de SDS.

PAH interferente (X)	[X]/[Pireno]	Error, %
B(a)a	1	-2.2 (-)
	10	32 (+)
B(ghi)p	1	1.3 (-)
	10	4.1 (+)
Fenantreno	1	-3.4 (-)
	10	11 (+)
B(e)p	1	9.1 (+)
B(a)p	1	4.5 (-)
Acenafteno	1000	1.2 (-)
Naftaleno	1	-6.0 (+)
Criseno	1	3.9 (-)
Fluoranteno	1	-3.9 (-)
	10	8.1 (+)
Fluoreno	1000	1.2 (-)
Db(ah)a	1	-2.2 (-)
	10	60 (+)
Antraceno	1	9.5 (+)

Valores medios correspondientes a dos determinaciones

Tabla 19

Interferencias en la determinación de benzo(a)antraceno en solución micelar de SDS.

PAH interferente (X)	[X]/[B(a)a]	Error, %
Pireno	1	4.6 (-)
	10	72 (+)
B(ghi)p	1	-1.0 (-)
	10	68 (+)
Fenantreno	1	-2.3 (-)
	10	20 (+)
B(e)p	1	5.5 (+)
B(a)p	1	-2.5 (+)
Acenafteno	1	-3.8 (+)
Naftaleno	1	-4.7 (+)
Criseno	1	-2.5 (-)
	10	29 (+)
Fluoranteno	1	-4.0 (-)
	10	32 (+)
Fluoreno	1	2.0 (-)
	10	62 (+)
Db(ah)a	1	8.0 (+)
Antraceno	1	-5.4 (+)

Valores medios correspondientes a dos determinaciones

Tabla 20

Interferencias en la determinación de benzo(a)pireno en solución micelar de SDS.

PAH interferente (X)	[X]/[B(a)p]	Error, %
Pireno	1	-4.4 (-)
	10	-24 (+)
B(a)a	1	-6.7 (-)
	10	-49 (+)
B(ghi)p	1	1.6 (-)
Fenantreno	1	-4.0 (+)
B(e)p	1	-5.6 (+)
Acenafteno	1	-6.7 (-)
	10	-47 (+)
Naftaleno	1	-5.3 (+)
Criseno	1	-3.2 (-)
	10	3.8 (+)
Fluoranteno	1	-2.0 (-)
	10	12 (+)
Fluoreno	1	-3.6 (+)
Db(ah)a	1	-6.1 (+)
Antraceno	1	-3.1 (-)
	10	25 (+)

Valores medios correspondientes a dos determinaciones

3.1.5.4.2. Determinación de pireno, benzo(a)pireno y benzo(ghi)perileno en solución micelar de CTAB

Los resultados de las interferencias en la determinación de estos PAHs, se resumen en las tablas 21, 22 y 23.

Cabe destacar la determinación de pireno en presencia de acenafteno y fluoreno que puede llevarse a cabo en relación PAH/analito = 1000/1 con errores del 3.2 y 2.1% respectivamente. También en esa misma relación puede determinarse benzo(ghi)perileno en presencia de fenantreno, acenafteno, naftaleno y fluoreno con errores inferiores al 5%.

En general, los errores cometidos cuando la determinación se lleva a cabo en solución micelar de CTAB son superiores a los obtenidos cuando ésta se efectúa en solución micelar de SDS.

Por otra parte los errores cometidos cuando la determinación se lleva a cabo en metanol son, en general superiores a cuando se lleva a cabo en medio micelar; así, en el caso concreto de la determinación del pireno en presencia de 1000 veces acenafteno o fluoreno, los errores cometidos son del 5 ó 31% superiores a los obtenidos en solución micelar de CTAB y del 15 ó 54% superiores a los obtenidos en medio micelar de SDS.

Tabla 21

Interferencias en la determinación de pireno en solución micelar de CTAB.

PAH interferente (X)	[X]/[Pireno]	Error, %
B(a)a	1	0.3 (-)
	10	68 (+)
B(ghi)p	1	3.5 (-)
Fenantreno	10	4.3 (-)
	100	45 (+)
B(e)p	1	8.3 (+)
B(a)p	1	1.6 (-)
Acenafteno	1000	-3.2 (-)
Naftaleno	100	-2.6 (-)
	1000	38 (+)
Criseno	10	1.0 (-)
	100	79 (+)
Fluoranteno	1	-10 (+)
Fluoreno	1000	2.1 (-)
Db(ah)a	10	1.2 (-)
	100	83 (+)
Antraceno	1	0.3 (-)
	10	20 (+)

Valores medios correspondientes a dos determinaciones

Tabla 22

Interferencias en la determinación de benzo(ghi)perileno en solución micelar de CTAB.

PAH interferente (X)	[X]/[B(ghi)P]	Error, %
Pireno	10	3.7 (-)
	100	40 (+)
B(a)a	1	-3.4 (-)
	10	15 (+)
Fenantreno	1000	-5.0 (-)
B(e)p	100	4.6 (-)
	1000	80 (+)
B(a)p	1	4.0 (-)
Acenafteno	1000	-0.8 (-)
Naftaleno	1000	-3.5 (-)
Criseno	10	-4.5 (-)
	100	80 (+)
Fluoranteno	10	6.7 (-)
	100	19 (+)
Fluoreno	1000	4.5 (-)
Db(ah)a	1000	9.5 (-)
Antraceno	1	70 (+)

Valores medios correspondientes a dos determinaciones

Tabla 23

Interferencias en la determinación de benzo(a)pireno en solución micelar de CTAB.

PAH interferente (X)	[X]/[B(a)P]	Error, %
Pireno	1	-3.8 (-)
	10	40 (+)
B(a)a	1	3.4 (+)
B(ghi)p	1	3.0 (-)
Fenantreno	10	0.5 (-)
	100	14 (+)
B(e)p	1	-2.3 (-)
	10	27 (+)
Acenafteno	10	3.1 (-)
	100	36 (+)
Naftaleno	1000	5.4 (-)
Criseno	1	-3.1 (-)
	10	22 (+)
Fluoranteno	1	-24 (+)
Fluoreno	100	-4.0 (-)
	1000	29 (+)
Db(ah)a	1	30 (+)
Antraceno	1	65 (+)

Valores medios correspondientes a dos determinaciones

3.1.6. Aplicación de los métodos propuestos a la evaluación fluorimétrica de PAHs en aire urbano

Con el fin de proponer nuevos métodos de determinación fluorimétrica de PAHs se aplica el estudio fluorimétrico desarrollado a la determinación de PAHs en aire urbano.

Las características de las muestras así como el procedimiento seguido para su preparación son los indicados en los apartados 2.3.1. y 2.4.3.1., de la parte experimental.

Los resultados obtenidos en la determinación fluorimétrica de PAHs en 4 muestras de aire urbano de la ciudad de Madrid se resumen en la tabla 24.

Las determinaciones se han llevado a cabo por los dos métodos fluorimétricos, es decir, en solución micelar de SDS y en CTAB. Para ello se han aplicado los métodos de la serie de patrones y de adiciones estándar en los dos medios, cuyos procedimientos se especifican en el apartado 2.4.1.6.2. Como queda reflejado en las figuras 20 y 21, que corresponden a la determinación de la muestra M1, el efecto matriz no es muy significativo, al menos en este tipo de muestras en las que el grado de contaminación no es elevado.

TABLA 24

Evaluación fluorimétrica de PAHs en muestras de aire urbano. (ng/m³ aire)

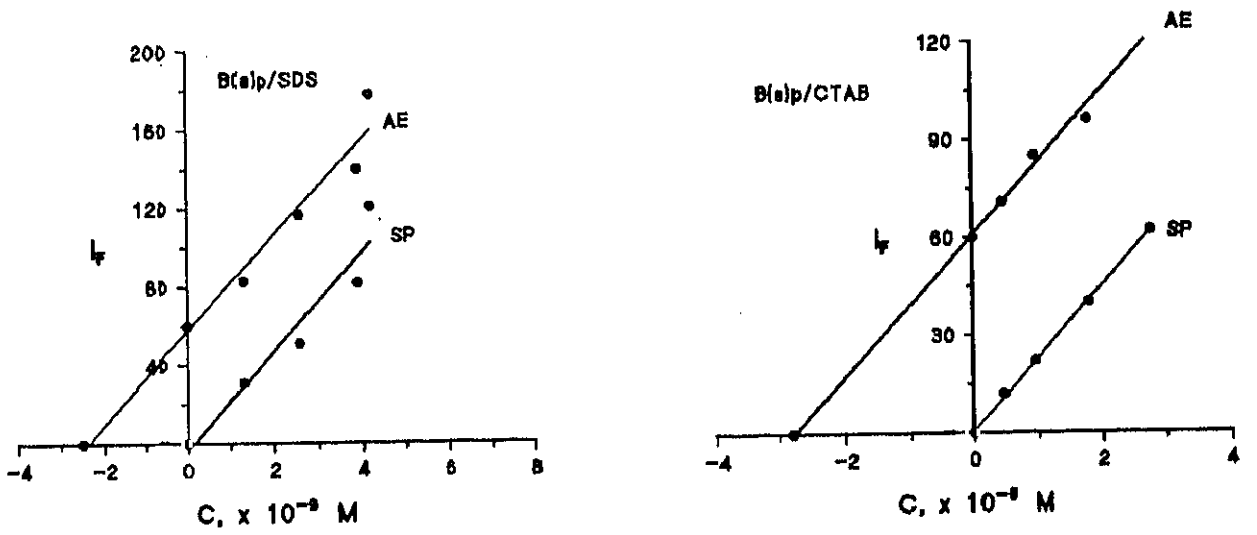
Muestra	Medio	Método	B(a)P	Pireno	B(a)A	B(ghi)P	Total
M1	SDS	SP	2.8	2.9	6.3	-	32
		AE	2.9	2.2	6.5	-	
	CTAB	SP	2.7	2.7	-	10	
		AE	3.3	2.4	-	9.4	
		GC	2.6	1.6	5.4	7.4	
M2	SDS	SP	4.6	5.0	6.9	-	80
		AE	4.4	4.6	6.6	-	
	CTAB	SP	3.8	4.5	-	10	
		AE	3.6	4.2	-	9.9	
		GC	3.6	4.0	5.0	8.5	
M3	SDS	SP	6.1	12	13.4	-	99.4
		AE	5.8	10.5	13	-	
	CTAB	SP	8.4	10.6	-	14	
		AE	7.9	10.5	-	13.6	
		GC	5.0	7.2	8.5	10	
M6	SDS	SP	15.7	17.2	16.3	-	116
		AE	15.1	14.0	14.5	-	
	CTAB	SP	17.4	23.2	-	17.6	
		AE	14.9	20.5	-	12.9	
		GC	7.6	16.5	7.3	3.5	

SP serie de patrones

AE adiciones estándar

GC cromatografía de gases. (resultados proporcionados por el Dr. Javier Méndez, Centro Nacional de Sanidad Ambiental del Instituto de Salud Carlos III.

(a)



(b)

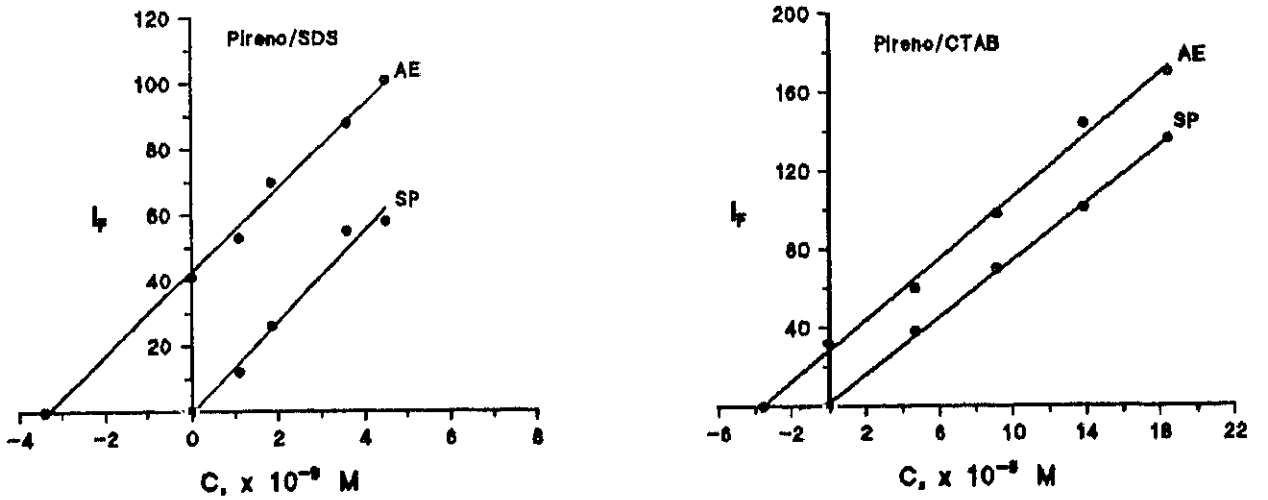


FIGURA 20: (a) determinación de benzo(a)pireno en aire (M1)

(b) Determinación de pireno en aire (M1)

AE: Adiciones estándar; SP: Serie de patrones

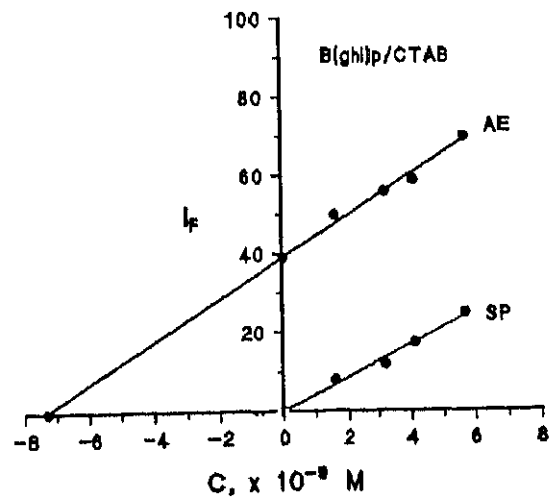
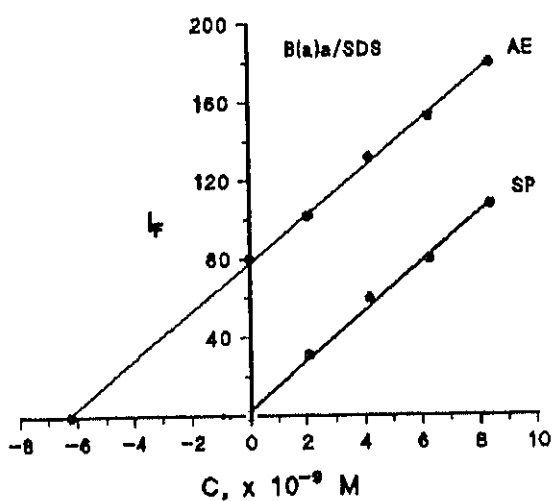


FIGURA 21: Determinación de benzo(a)antraceno (SDS) y de benzo(ghi)perileno (CTAB) en aire (M1)
 AE: Adiciones estándar; SP: Serie de patrones

Con el fin de comprobar la validez de los métodos propuestos, los resultados se han comparado con los obtenidos por cromatografía de gases (GC), aplicando el procedimiento de la EPA TO-13 (279). Estos resultados se encuentran también especificados en la tabla 24, en la que además se indican los contenidos correspondientes a la totalidad de los 16 PAHs determinados por esta técnica cromatográfica.

Los resultados obtenidos por los métodos fluorimétricos son superiores a los obtenidos por GC. Estas

diferencias pueden atribuirse a las limitaciones que los métodos fluorimétricos poseen, en lo que se refiere a la selectividad, con respecto a los métodos cromatográficos. No obstante, los métodos propuestos pueden ser adecuadas para la evaluación del contenido individual de estos PAHs cuando se trata de muestras poco contaminadas, debido a la simplicidad, rapidez y sensibilidad que ofrecen en la determinación de estos contaminantes.

3.2. ESTUDIO DE PAHs POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN, HPLC, CON DETECCIÓN FLUORIMÉTRICA

3.2.1. Separación de PAHs por cromatografía líquida micelar (CLM) en régimen isocrática

Como se ha podido comprobar en el estudio fluorimétrico de PAHs, la utilización de disoluciones micelares de tensioactivos iónicos, y en particular de SDS, aumentan la intensidad de fluorescencia para la mayoría de los PAHs estudiados, obteniéndose en el caso concreto del pireno un factor de sensibilización de 8.6 en solución micelar de SDS frente a cuando la determinación se lleva a cabo en medio metanol.

Tomando como base este estudio y teniendo en cuenta, que en la revisión bibliográfica realizada, son escasos los estudios de investigación por HPLC en los que se emplean soluciones micelares como fases móviles para la determinación de este tipo de contaminantes (181 y 280), en este apartado se lleva a cabo un estudio de separación y cuantificación de PAHs por HPLC, utilizando como fases móviles soluciones micelares de SDS de diferentes concentraciones y como fases estacionarias columnas de fase químicamente ligada de distinta naturaleza. Con el fin de obtener la máxima información posible a cerca del comportamiento, que presentan estos compuestos con este tipo de fases móviles en la separación cromatográfica, el estudio se ha realizado en régimen isocrático y en gradiente, como a continuación se expone.

3.2.1.1. Efecto de la naturaleza de la fase estacionaria

En la bibliografía consultada se recomienda con el fin de mejorar la transferencia de masa y por consiguiente la eficacia, problema difícil de resolver cuando se trabaja en CLM, adicionar a la fase móvil pequeños porcentajes de alcoholes tales como n-propanol, n-butanol así como termostatar la columna analítica a 40 - 60°C (281). Por la misma razón se recomienda también la utilización de columnas cromatográficas con cadenas hidrocarbonadas cortas (282).

Teniendo en cuenta estas recomendaciones se ha llevado a cabo un estudio sistemático en el que las variables cromatográficas estudiadas han sido las siguientes: naturaleza de la fase estacionaria, composición de la fase móvil y temperatura de la columna cromatográfica (2.4.2.).

Las columnas utilizadas en este estudio han sido C18, C1 y C4, por lo que su exposición se va a llevar a cabo tomando como base la naturaleza de las fases estacionarias utilizadas.

Para la detección fluorimétrica de los PAHs se ha utilizado el detector de filtros especificado en la parte experimental de esta Memoria (apartado 2.1.2.a.).

3.2.1.1.1. Columna C18 Nucleosil

Acondicionamiento de la columna

Como es sabido cuando se trabaja en cromatografía líquida, es necesario como paso previo, pasar a través de la columna analítica la fase móvil que se vaya a utilizar durante un cierto tiempo, que suele ser del orden de 15 minutos como mínimo.

Cuando se utiliza fase móvil hidro-orgánica, como por ejemplo acetonitrilo/agua, las columnas de sílice enlazadas a cadenas hidrocarbonadas vienen acondicionadas previamente de la casa comercial.

Sin embargo cuando se utiliza una fase móvil distinta a la habitual, es necesario acondicionar la columna. Para ello, durante un cierto período de tiempo mas o menos largo, se pasan cantidades crecientes de la nueva fase móvil a través de la columna. Para comprobar la saturación de la columna se toma como base la reproducibilidad en el tiempo de retención de uno de los componentes, que se inyecta sucesivas veces a lo largo del acondicionamiento.

Tras una serie de ensayos experimentales se ha seleccionado el gradiente lineal de acondicionamiento que figura en la tabla 25, adicionando a la disolución micelar de SDS un 20% de n-butanol como modificador orgánico de la fase móvil.

Tabla 25

Gradiente de acondicionamiento de la columna

Tiempo, min.	A, %	B, %
0.0	0	100
3.0	0	100
3.1	5	95
60.0	65	35
90.0	65	35

A: 0.15 M SDS, 20% n-butanol

B: Agua

Temp.: 60°C

Caudal: 1 ml/min

Se ha utilizado inicialmente 100% de agua para mojar el relleno de la columna, con el fin de mejorar la transferencia de masa. La concentración de la disolución micelar de SDS se ha ido aumentando a lo largo del gradiente de forma moderada, evitando así variaciones bruscas que darían lugar a una menor duración de la columna.

Por otra parte se ha termostatado la columna a 60°C con el fin de evitar subidas de presión, que se originan como consecuencia de la elevada viscosidad de la disolución de la fase móvil utilizada.

Para comprobar la saturación de la columna se ha tomado como referencia el tiempo de retención del naftaleno por ser, de los analitos estudiados, el primero en eluir.

Separación cromatográfica

Para ello se ha inyectado un patrón de naftaleno en concentración de 29.3 ng/ μ l utilizando las condiciones experimentales siguientes: fase móvil SDS 0.15 M con 20% butanol/agua: 65/35 (v/v), caudal de 1 ml/min y temperatura 60°C. En estas condiciones se obtiene un tiempo de retención para el naftaleno muy elevado, de 39 minutos (figura 22).

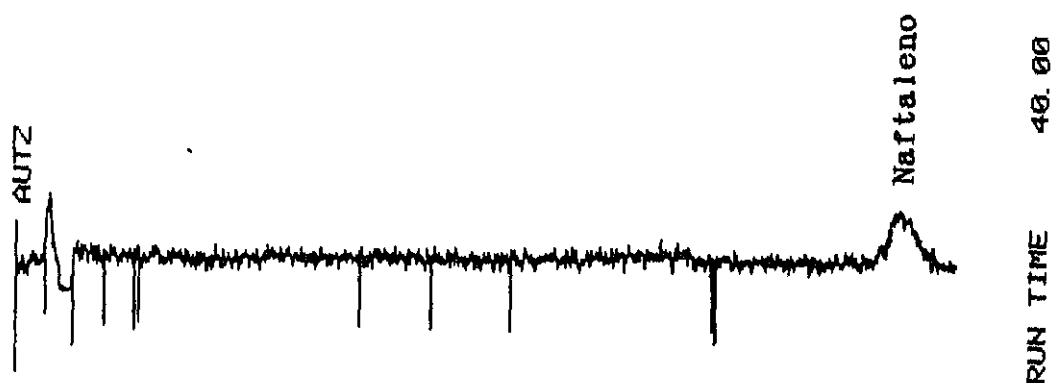


FIGURA 22 : Cromatograma de HPLC del naftaleno, 29.3 ng/ μ l

Columna: Nucleosil C18, 5 μ m (150 x 4.8 mm). Temp.: 60°C. Fase móvil: SDS 0.15 M con 20% n-butanol/agua: 65/35 (v/v). Caudal: 1 ml/min. Detección fluorimétrica, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 254/375 nm. V. inyección: 20 μ l.

Con el fin de disminuir el tiempo de retención se incrementó la fuerza de la fase móvil, aumentando para ello el porcentaje de SDS. El cromatograma de la figura 23 se ha obtenido inyectando una mezcla patrón de naftaleno y acenafteno en concentraciones de 51.3 y 13 ng/ μ l respectivamente, con el fin de observar además el poder de resolución de la columna para los dos compuestos. La fase móvil utilizada en este caso ha sido SDS 0.15 M con 20% n-butanol.

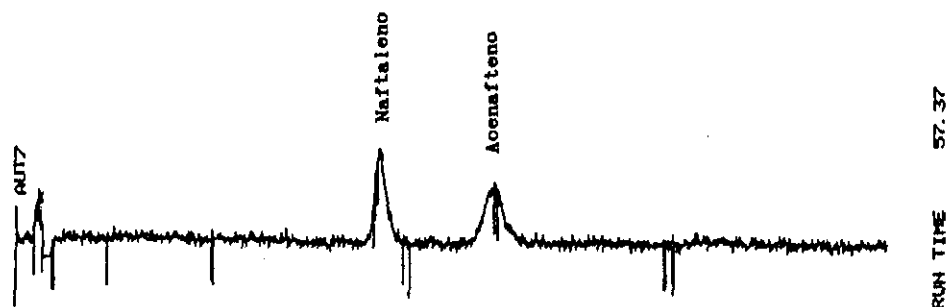


FIGURA 23 : Cromatograma de HPLC de una mezcla patrón de naftaleno y acenafteno, 51.3 y 13 ng/ μ l respectivamente.

Columna: Nucleosil C18; 5 μ m (150 x 4.6 mm). Temp.: 60°C. Fase móvil: SDS 0.15 M con 20% n-butanol. Caudal: 1 ml/min. Detección fluorimétrica, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 254/375 nm. V. inyección: 20 μ l.

En estas condiciones los tiempos de retención son de 25.33 y 32.17 minutos para el naftaleno y acenafteno respectivamente. Como puede observarse en dicha figura se obtiene buena separación, pero los picos cromatográficos son bastante anchos y los tiempos de retención siguen siendo elevados. A la vista de estos resultados se procede al estudio de la separación cromatográfica utilizando columnas de distinta naturaleza de relleno.

3.2.1.1.2. Columna C1 Ultremex. Influencia de la concentración de SDS

Como se ha indicado anteriormente, Dorsey (274) recomienda para la separación por CLM de analitos, en general con un sólo anillo aromático y más polares que los PAHs, la utilización de columnas de cadenas hidrocarbonadas cortas así como la adición de pequeños porcentajes de alcoholes de bajo peso molecular, como modificadores orgánicos de la fase móvil micelar, y termostatación de la columna cromatográfica a 40°C. Teniendo en cuenta estas consideraciones a continuación se expone el estudio realizado con este tipo de columnas.

Acondicionamiento de la columna

Para ello se ha aplicado el gradiente lineal indicado en la tabla 26. La concentración de SDS utilizada ha sido 0.05 M, a la que se le ha adicionado el 2 % de n-propanol como modificador orgánico de la fase móvil.

TABLA 26

Gradiente de acondicionamiento de la columna

Tiempo, min	A, %	B, %
0.0	0	100
15.0	0	100
90.0	100	0
120.0	100	0

A: SDS 0.05 M, 2% n-propanol

B: Agua

Temp.: 40°C

Caudal: 1 ml/min

Influencia de la concentración de SDS en la fase móvil

En primer lugar y en las condiciones cromatográficas indicadas se inyectó un patrón de naftaleno de concentración 29,3 ng/μl.

El tiempo de retención resultó ser de 13.3 minutos, bastante inferior al que se obtiene cuando se utiliza la columna C18, lo cual significa que la columna C1 resulta ser en principio más adecuada para el estudio de la separación de este tipo de analitos, por lo que se procede a estudiar la influencia de la concentración de SDS en la separación cromatográfica.

Como fase móvil micelar se han utilizado diferentes concentraciones de SDS, 0.05, 0.10, 0.15 y 0.20 M, modificando dicha fase con un 2% n-propanol. En todas las

experiencias la columna se ha termostatado a la temperatura de 40°C y el caudal utilizado ha sido de 1 ml/min.

En el diagrama correspondiente a la figura 24, se representan los factores de capacidad (K') de cada uno de los PAHs estudiados frente a la concentración de SDS utilizada en la fase móvil. Estos factores de capacidad se han calculado, inyectando soluciones individuales de los 13 PAHs en concentraciones de 0.13 a 16 ng/μl y aplicando la siguiente expresión matemática:

$$K' = (t_r - t_0)/t_0$$

donde:

t_r : tiempo de retención

t_0 : tiempo muerto²

² Determinación del tiempo muerto en CLM

Puesto que el tiempo muerto (t_0) es un parámetro necesario para calcular los factores de capacidad (K') de los analitos, se ha procedido a su determinación. Según la bibliografía se consigue buena reproducibilidad en la determinación del tiempo muerto utilizando NaNO_3 como compuesto no retenido por la fase estacionaria, con sistema de detección UV-visible (282).

En el presente trabajo de investigación se ha utilizado un detector fluorimétrico y al inyectar NaNO_3 11.8 mM se obtiene una señal muy pequeña; esta señal desaparece, incluso utilizando concentraciones superiores de NaNO_3 , cuando se emplea fase móvil micelar en concentraciones superiores a 0.1 M de SDS.

Tras una serie de ensayos en los que se utilizaron diferentes compuestos fluorescentes y no fluorescentes se seleccionó la acetona ya que dió una señal más elevada, con el mismo resultado del tiempo muerto ($t_0 = 1.14$ min) que el NaNO_3 y con buena reproducibilidad. En

Se observa en la figura 24, que al aumentar la concentración de SDS en la fase móvil se produce una disminución en los factores de capacidad de todos los PAHs estudiados, lo cual significa que conforme aumenta la concentración de SDS lo hace la fuerza de la fase móvil.

las figuras a y b aparecen los picos cromatográficos correspondientes a las inyecciones del NaNO_3 y acetona respectivamente.

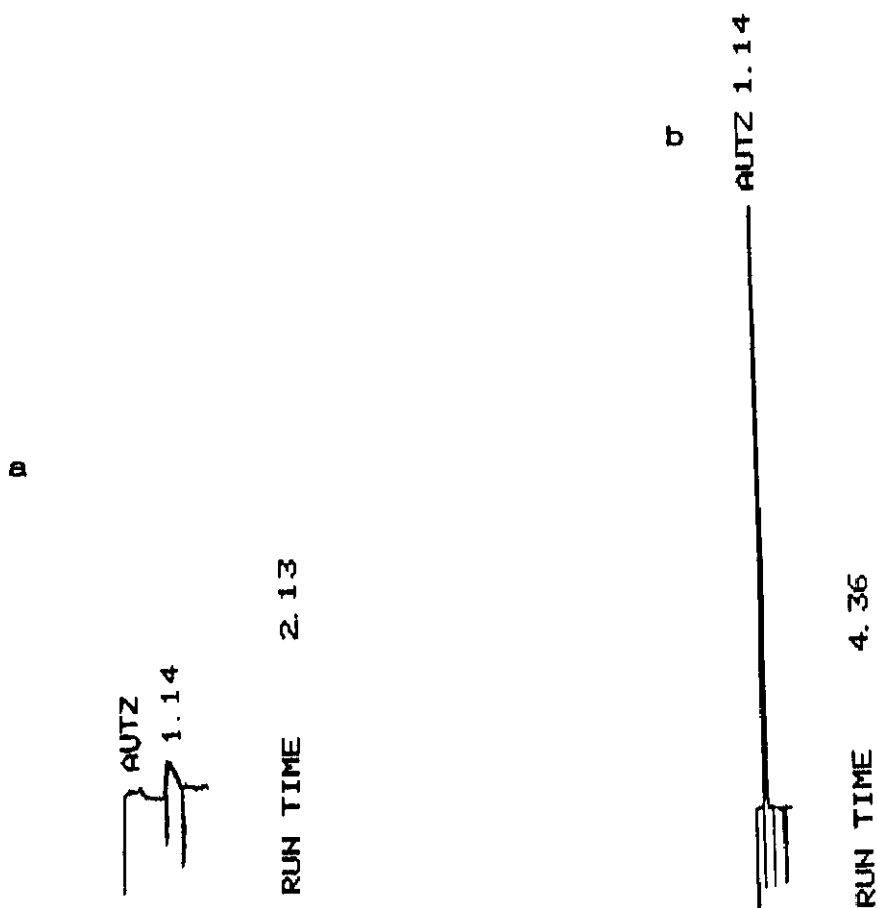


FIGURA a: NaNO_3 11.8 mM; FIGURA b: Acetona 99,9%

Columna: Ultremex C1, 3 μm (100x4 mm). Temp.: 60°C. Fase móvil: SDS 0.05 M con 2% n-propanol. Caudal: 1 ml/min. Detección fluorimétrica, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$: 254/375 nm. V. inyección: 20 μl .

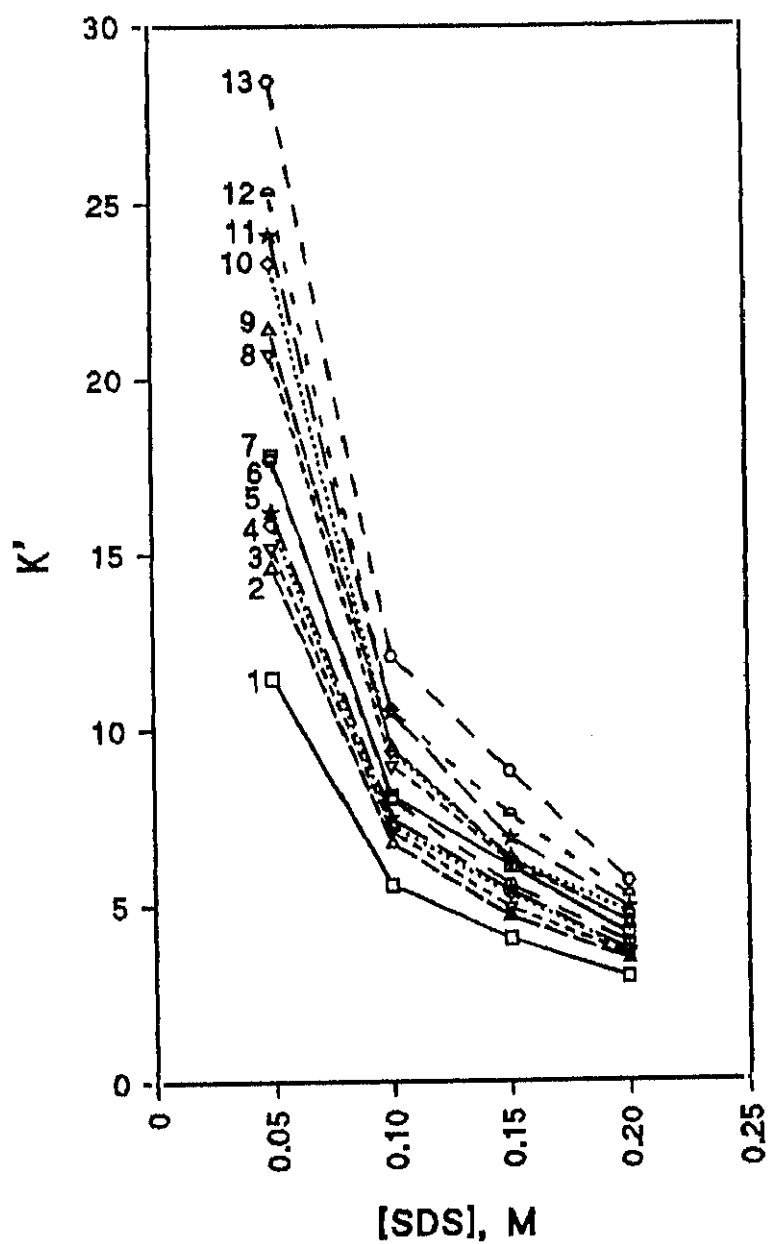


FIGURA 24: Influencia de la concentración de SDS en la separación cromatográfica.

Para las concentraciones de 0.10, 0.15 y 0.20 M de SDS los picos cromatográficos se encuentran solapados unos con otros, tal y como puede apreciarse en dicha figura. Para la concentración de 0.05 M de SDS los tiempos de retención son muy elevados si bien la separación se mejora aunque siguen existiendo problemas de solapamiento para los grupos acenafteno-fluoreno-fenantreno- antraceno; fluoranteno-pireno; benzo(a)antraceno-criseno; y benzo(e)pireno-benzo(a)pireno-dibenzo(ah)antraceno, al mismo tiempo que los picos cromatográficos continúan siendo bastante anchos.

Por último cabe destacar, que este tipo de columna da lugar a altas subidas de la presión debido al diámetro de partícula de relleno, 3 μm , y al empleo de solución micelar de SDS. Se seleccionó este tamaño de partícula con el fin de mejorar la mala eficacia que se obtiene cuando se trabaja en CLM para la separación de analitos apolares.

3.2.1.1.3. Columna C4 Hypersil. Efecto de las variables cromatográficas

Teniendo en cuenta los inconvenientes que presenta la columna cromatográfica C1 en la separación de PAHs se procede a la utilización de otra de cadena más larga y tamaño de partícula superior como posible fase estacionaria para la separación por CLM de estos compuestos.

Acondicionamiento de la columna

En primer lugar se procedió el acondicionamiento de

la columna utilizando para ello el gradiente lineal que figura en la tabla 25 del apartado anterior.

El tiempo de retención del naftaleno en este caso fué de 9.2 minutos consiguiéndose su reproducibilidad al cabo de 109 minutos una vez iniciado el programa de acondicionamiento. Acondicionada la columna se procedió al estudio de optimización de las variables cromatográficas.

Efecto de las variables cromatográficas

Las variables cromatográficas consideradas en este estudio han sido: composición de la fase móvil y temperatura de la columna cromatográfica.

A) Composición de la fase móvil

Se ha estudiado el efecto de la concentración de solución micelar de SDS así como la naturaleza y porcentaje de modificador orgánico.

A.1. Concentración de SDS

Para la realización de este estudio se han utilizado disoluciones de SDS en concentraciones 0.05, 0.10, 0.15, y 0.20 M, a las que se les ha adicionado un 2% de n-pronanol como modificador orgánico de la fase móvil. La columna se ha termostatado a 60°C y el caudal utilizado ha

sido de 1 ml/min.

En la figura 25 se representan los factores de capacidad de los PAHs en función de la concentración de SDS. Los resultados son inferiores a los obtenidos cuando se utiliza como fase estacionaria la columna C1 siguiendo la misma secuencia, es decir, conforme aumenta la concentración de SDS, disminuyen los factores de capacidad.

Cabe destacar que en el orden de elución puede influir la naturaleza de la fase estacionaria, así por ejemplo en el caso concreto de la columna C4 se invierte el orden de elución de las parejas benzo(a)antraceno-criseno y benzo(a)pireno-benzo(e)pireno cuando la concentración de SDS utilizada en la fase móvil es igual o superior a 0.10 M, hecho que no ocurre con la columna C1.

Para la concentración de SDS 0.05 M no se han detectado benzo(e)pireno, benzo(ghi)perileno y dibenzo(ah)antraceno, correspondientes a los picos cromatográficos 10, 12 y 13, por lo que para completar este estudio se selecciona la concentración de SDS 0.1 M.

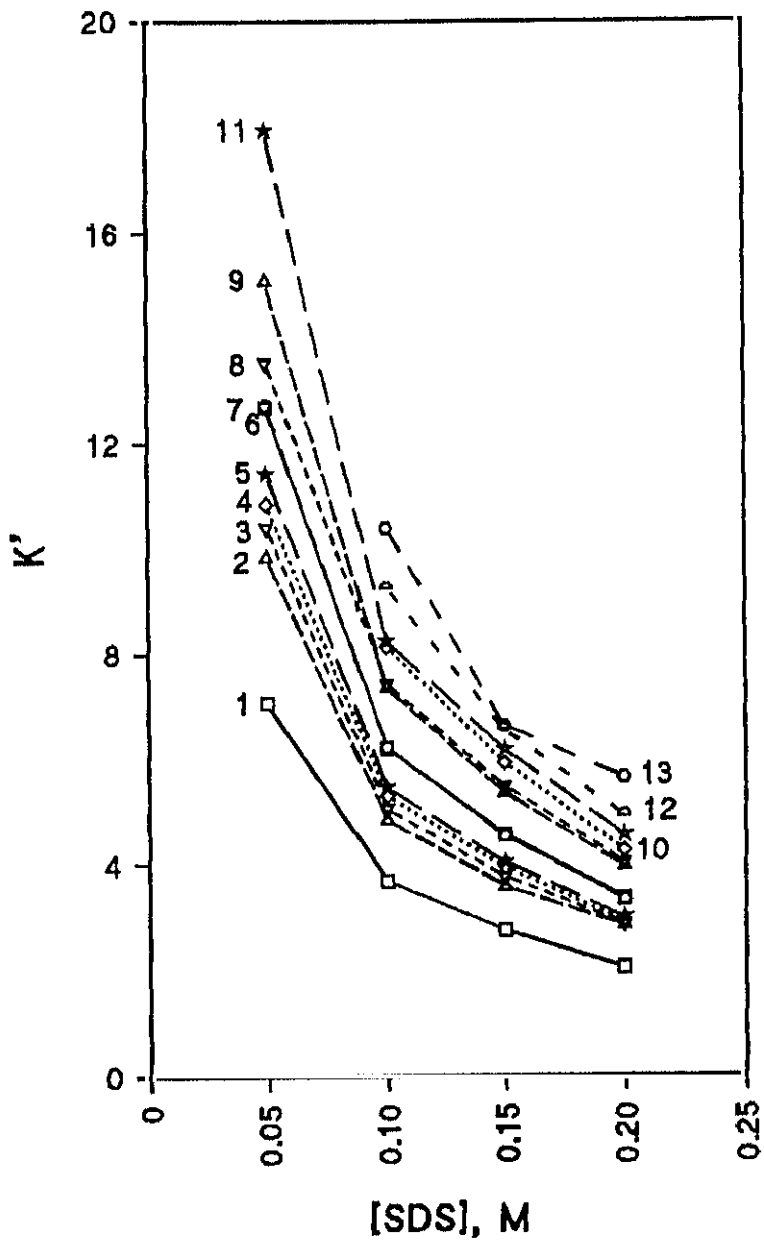


FIGURA 25: Influencia de la concentración de SDS en la separación cromatográfica

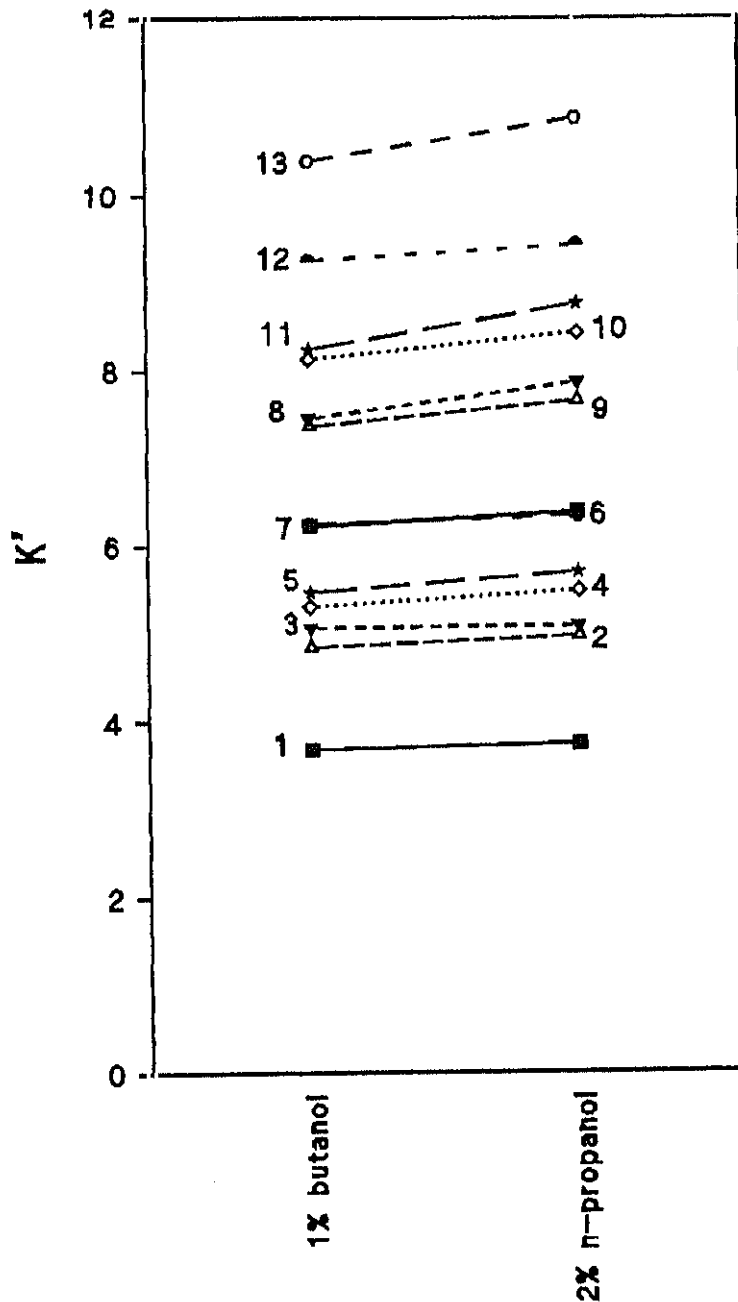
A.2. Naturaleza y porcentaje de modificador

a. Naturaleza del modificador

Como se ha indicado anteriormente es importante la utilización de pequeños porcentajes de disolventes orgánicos como modificadores de la fase móvil micelar.

Para ello se han seleccionado los dos tipos de alcoholes así como los porcentajes más recomendados por la bibliografía (283), n-propanol al 2% y n-butanol al 1%, como modificadores de la fase móvil micelar de SDS 0.1 M. La columna se ha termostatado a 60°C y el caudal utilizado ha sido de 1 ml/min. Los resultados en términos de factores de capacidad se representan en la figura 26.

Puede observarse que las diferencias en los factores de capacidad de los 13 PAHs son mínimas, de donde se deduce que puede utilizarse indistintamente bien 1% de n-butanol o bien 2% de n-propanol como modificador orgánico. En el caso del n-propanol se obtienen mayores diferencias en los valores de K' de las parejas benzo(a)antraceno-criseno y benzo(e)pireno-benzo(a)pireno por lo que se considera este como modificador orgánico más adecuado para la separación de estos PAHs.



PAH	c. ng/μl
1- Naftaleno	18
2- Fluoreno	8.3
3- Acenafteno	11
4- Fenantreno	0.27
5- Antraceno	0.23
6- Fluoranteno	3.8
7- Pireno	1.3
8- B(a)a	0.50
9- Criseno	0.72
10- B(e)p	1.1
11- B(a)p	0.13
12- B(ghi)p	4.2
13- Db(ah)a	5.3

FIGURA 28: Influencia de la naturaleza del modificador en la separación cromatográfica

b. Porcentaje del modificador orgánico

Seleccionado el n-propanol como modificador orgánico se ha realizado este estudio fijando las siguientes variables cromatográficas: fase móvil micelar 0.1 M de SDS, temperatura de la columna analítica 60°C y caudal de 1 ml/min.

Los resultados obtenidos, variando el porcentaje de n-propanol del 1 al 3%, se representan en la figura 27. Se observa que la mejor separación se obtiene con 1% de n-propanol si bien los tiempos de retención son bastante superiores a cuando se emplea el 3% de modificador orgánico, por lo que se selecciona el porcentaje intermedio del 2%.

B) Temperatura

Con el fin de estudiar la influencia que la temperatura ejerce sobre la separación cromatográfica de los PAHs se ha termostatado la columna analítica a diferentes temperaturas, en el intervalo de 20 a 70°C. Para ello se han inyectado mezclas patrones a niveles de concentración de 0.1-44 ng/μl de los 5 PAHs siguientes: naftaleno, acenafteno, fenantreno, pireno y criseno debido a que los restantes PAHs producen solapamientos que interferirían en la observación de dicho estudio. La fase móvil micelar utilizada ha sido SDS 0.1 M a la que se le ha adicionado 2% n-propanol como modificador orgánico y caudal de 1 ml/min. Seguidamente se expone la influencia que la temperatura ejerce sobre los factores de capacidad

de los PAHs y, la eficacia y presión de la columna.

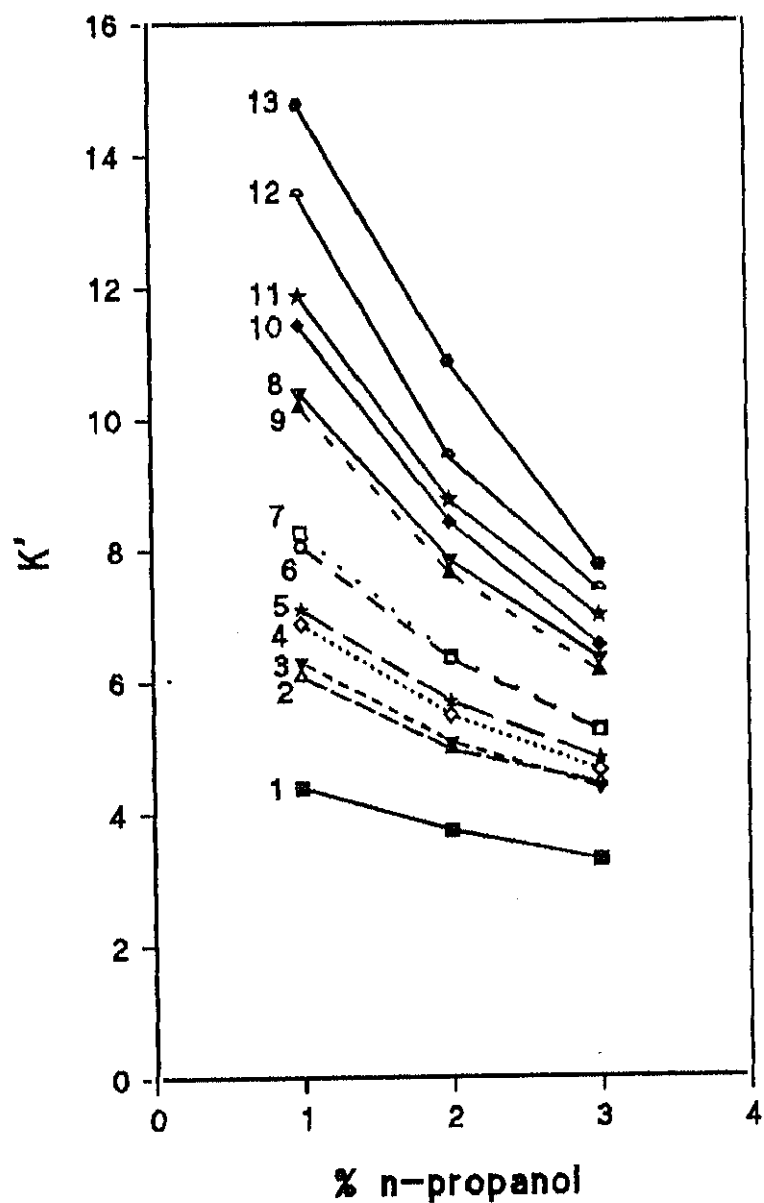
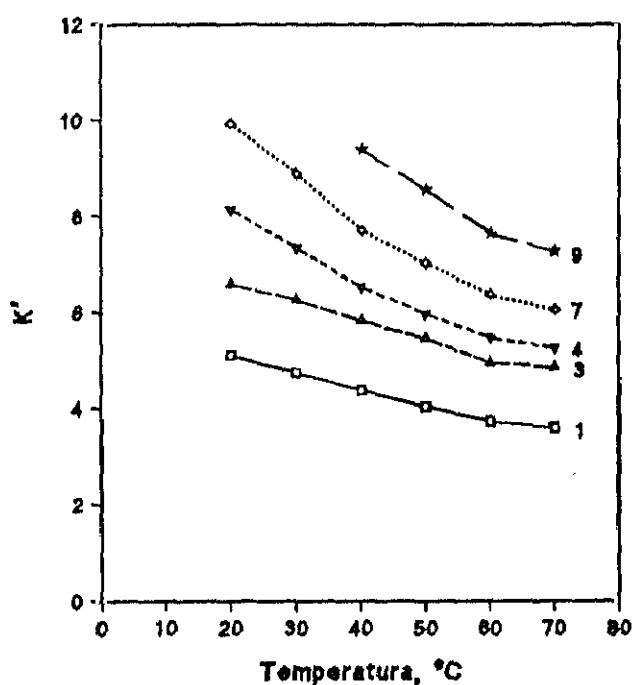


Figura 27: Influencia del porcentaje de modificador en la separación cromatográfica

B.1. Variación de los factores de capacidad con la temperatura

Como puede observarse en la figura 28, los factores de capacidad de los PAHs disminuyen conforme aumenta la temperatura, hecho confirmado en la bibliografía (284). Los valores de los factores de capacidad del criseno a 20 y 30°C no se encuentran representados debido a que no han sido detectados.



PAH	ci: ng/l
1- Naftaleno	44
3- Acenafteno	4.3
4- Fenantreno	0.1
7- Pireno	8.0
9- Criseno	4.0

FIGURA 28: Variación de los factores de capacidad con la temperatura

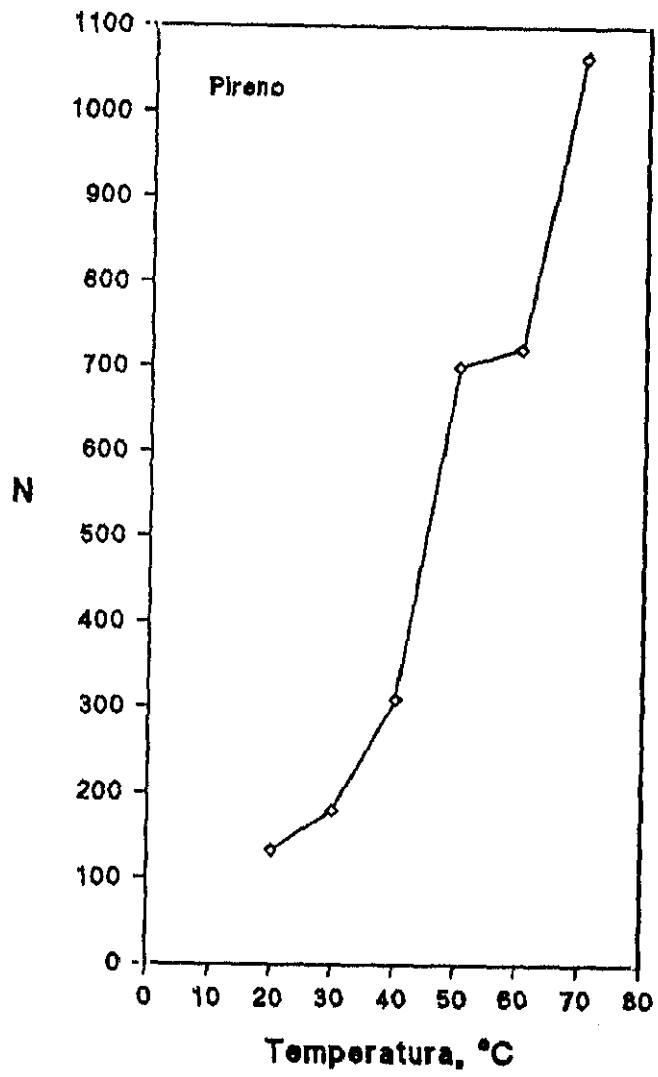


FIGURA 29: Variación de la eficacia de la columna con la temperatura

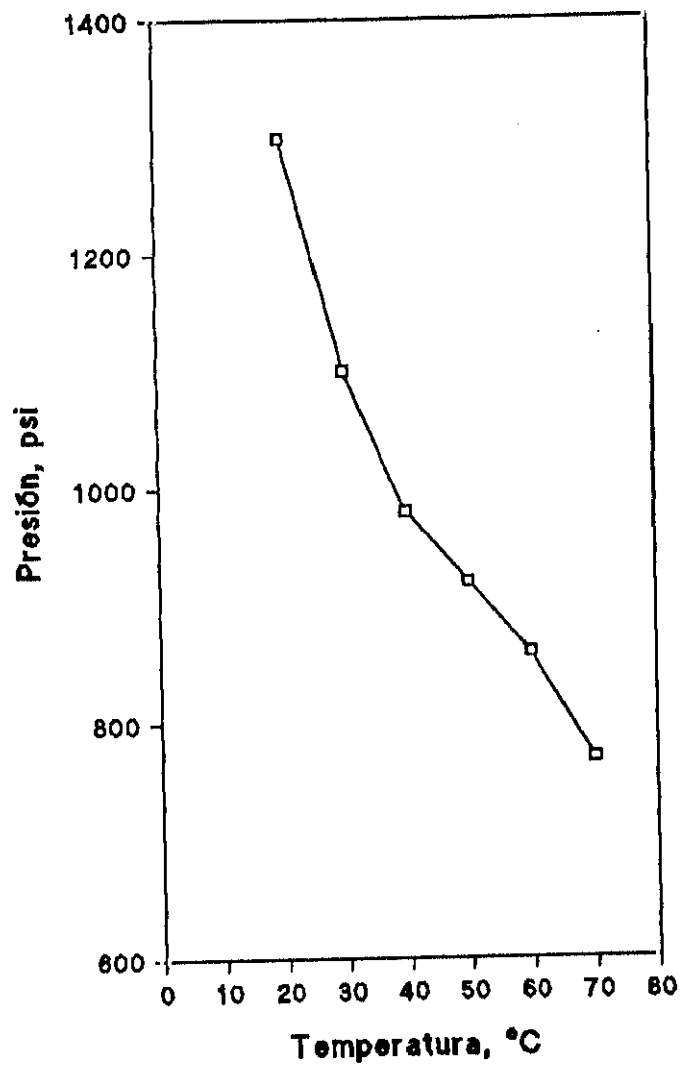


FIGURA 30: Variación de la presión de la columna con la temperatura

con objeto de proteger la columna y por consiguiente alargar su duración.

Por consiguiente la temperatura de 60°C es suficiente para conseguir menores factores de capacidad en la separación de PAHs, mayor eficacia y menor presión en la columna. A temperaturas superiores pueden producirse deterioros en las columnas cromatográficas.

Como resultado de este estudio puede decirse que es posible la separación de 5 PAHs de los 13 estudiados por CLM en régimen isocrático y en la condiciones indicadas anteriormente.

Por último cabe destacar que si bien la separación cromatográfica no es muy satisfactoria desde el punto de vista práctico, sí es interesante teniendo en cuenta que en la bibliografía consultada no existen estudios de separación de PAHs por CLM con este tipo de columnas cromatográficas, a excepción de uno de ellos en el que se utiliza una columna alquilnitrilo y en el que únicamente se separan 2 PAHs de 6 estudiados (181).

Por otra parte también es importante indicar que una vez acondicionadas las columnas, éstas se mantienen equilibradas para llevar a cabo el correspondiente estudio cromatográfico sin necesidad de acondicionarlas de nuevo.

3.2.2. Separación de PAHs por cromatografía líquida micelar, CLM, en gradiente

Dado que no son muy satisfactorios los resultados obtenidos en la separación cromatográfica de PAHs por CLM en régimen isocrático, se procede al estudio de la separación por cromatografía en gradiente. Para ello se utilizan dos columnas de distinta naturaleza C4 y C18.

Para la detección de los PAHs se utiliza el detector fluorimétrico de filtros Waters 420 (excitación 254 nm y emisión 375 nm).

3.2.2.1. Columna C4 Hypersil y fase móvil solución acuosa de SDS/agua

Con la columna cromatográfica C4, acondicionada según se indica en el apartado 3.2.1.1.3. y fase móvil micelar de SDS/agua se efectúan una serie de ensayos en los que se seleccionan las condiciones experimentales que se indican en la tabla 27. En estas condiciones se obtiene el cromatograma de la figura A, correspondiente a la separación de los 5 PAHs: naftaleno, acenafteno, fenantreno, pireno y criseno en concentraciones 0.1-44 ng/ μ l, quedando solapados el resto de los PAHs. Los PAHs de elevado peso molecular benzo(a)antraceno, benzo(e)pireno, benzo(a)pireno, dibenzo(ah)antraceno y benzo(ghi)perileno no se separan, solapan con el criseno. Aunque el número de PAHs separados es el mismo que en régimen isocrático, lógicamente se obtiene mayor resolución por cromatografía en gradiente.

TABLA 27

Condiciones experimentales utilizadas en la separación cromatográfica

Gradiente de la fase móvil:

Tiempo, min	A, %	B, %
0.0	50 (0.1)	50
9.0	100	0

A: 0.15 M de SDS, 12% de n-propanol

B: Agua

(0.1): Código correspondiente al gradiente convexo utilizado

Caudal: 1 ml/min

Temp.: 60°C

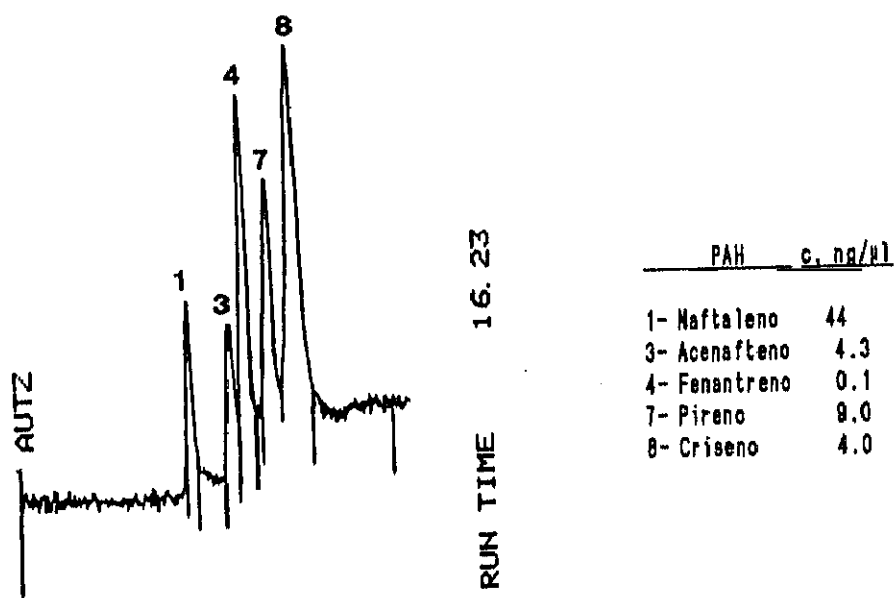


FIGURA A: Cromatograma de HPLC de una mezcla patrón de 5 PAHs.

Columna: Hypersil C4, 5 μm (100x4.6 mm). Temp.: 60°C. Fase móvil: gradiente (véase tabla 27). Caudal: 1 ml/min. Detección fluorimétrica, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 254/375. V. inyección: 20 μl.

3.2.2.2. Columna C18 Nucleosil y fase móvil acetoneitrilo/solución acuosa de SDS

Teniendo en cuenta que no es posible la separación cromatográfica de los 13 PAHs estudiados utilizando columnas de cadena corta, C4, se lleva a cabo el estudio cromatográfico en gradiente utilizando para ello una columna de cadena larga, C18 y fase móvil micelar con porcentajes de modificador elevados, superiores a los empleados en el apartado 3.2.1., con el fin de evitar por una parte presiones elevadas y por otra, tiempos de retención elevados y conseguir al mismo tiempo mejor eficacia. Dicho estudio se realiza utilizando como fase estacionaria la columna C18 Nucleosil y como fase móvil acetoneitrilo/solución acuosa de SDS.

3.2.2.2.1. Estudios preliminares

En primer lugar, con fines comparativos, se lleva a cabo un estudio en fase reversa utilizando la columna cromatográfica C18 Nucleosil, que posteriormente se utilizará en el estudio de separación por CLM en gradiente.

Con el fin de optimizar por una parte la naturaleza de la fase móvil y por otra, el gradiente de elución se efectúan una serie de experiencias. Para ello se estudian los eluyentes metanol/agua y acetoneitrilo/agua, por ser éstos los más utilizados según la revisión bibliográfica realizada (apartado 1.3.1.1.).

Con caudal de 1 ml/min y temperatura ambiente de 22°C, se realizan una serie de experiencias seleccionando el acetonitrilo/agua como eluyente, debido a que el metanol/agua presenta deriva en la línea base.

Posteriormente se efectúan varios ensayos en los que se utilizan porcentajes de acetonitrilo/agua en el intervalo de 70 a 80%.

El cromatograma de la figura 31, se ha obtenido utilizando como fase móvil 70% de acetonitrilo/agua, caudal de 1 ml/min y temperatura ambiente de 22°C. Como puede observarse se obtiene buena separación, de los 13 PAHs en estudio se separan 11 quedando solapadas las parejas acenafteno-fluoreno y criseno-benzo(a)antraceno, siendo el orden de elución el indicado en el cromatograma.

Con el fin de obtener mayor resolución cromatográfica se estudian varios gradientes de acetonitrilo/agua en el intervalo de 45-65% a 80-90%, aplicados éstos durante un tiempo de 32 minutos.

En la tabla 28 se indican las condiciones óptimas de separación. En estas condiciones se obtiene el cromatograma de la figura 32.

En todas las experiencias se separan también 11 PAHs si bien se obtiene mayor resolución que en régimen isocrático, quedando solapadas las mismas parejas de PAHs acenafteno-fluoreno y criseno-benzo(a)antraceno.

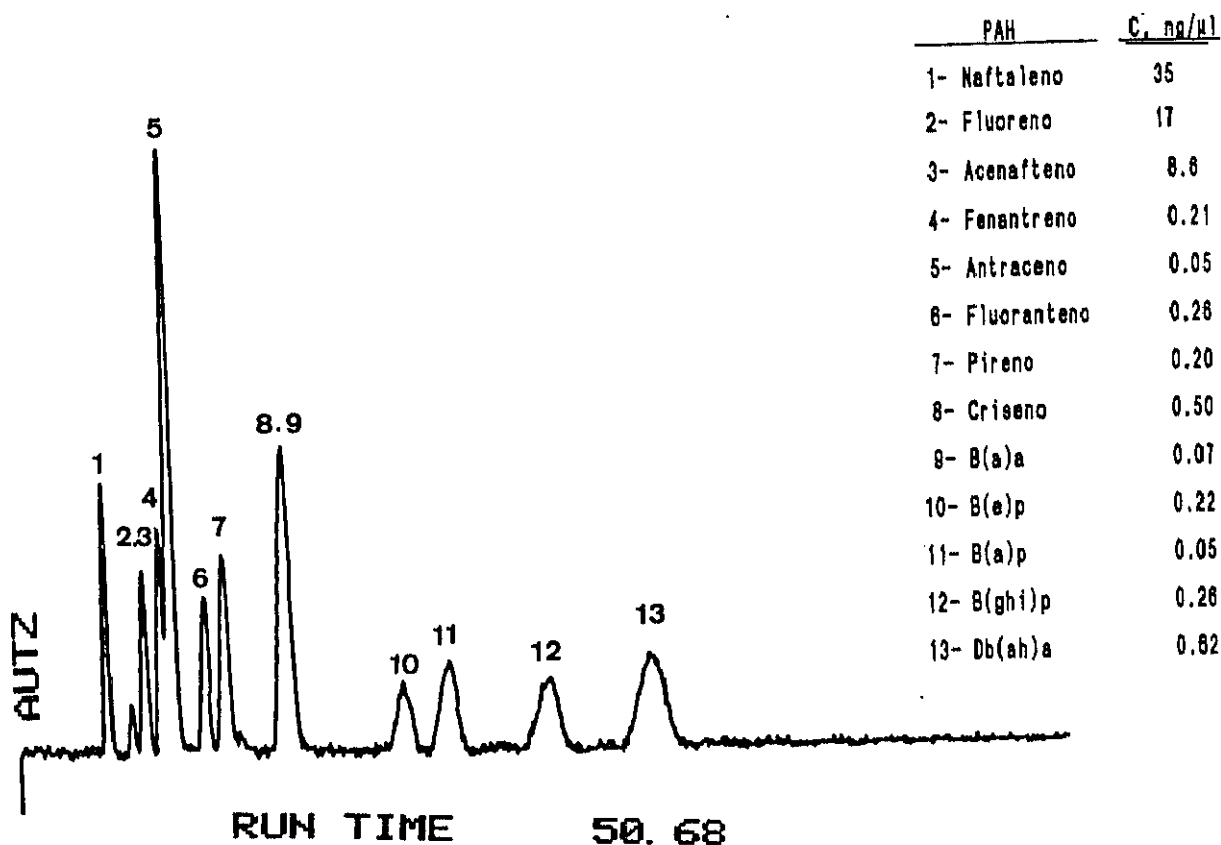


FIGURA 31 : Cromatograma de HPLC de una muestra patrón de 13 PAHs.

Columna: Nucleosil C18; 5 μm (150 x 4.6 mm). Temp.: 22°C. Fase móvil: 70/30, ACN/agua, (v/v). Caudal: 1 ml/min. Detección fluorimétrica, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 254/375 nm. V. inyección: 20 μl.

TABLA 28

Condiciones experimentales utilizada en la separación cromatográfica
Gradiente de la fase móvil:

Tiempo, min	A, %	B, %
0.0	55	45
2.0	55	45
30.0	85	15
38.0	85	15
40.0	55	45

A: Acetonitrilo, B: Agua (Milli Q)
Caudal: 1 ml/min, Temp.: 22°C

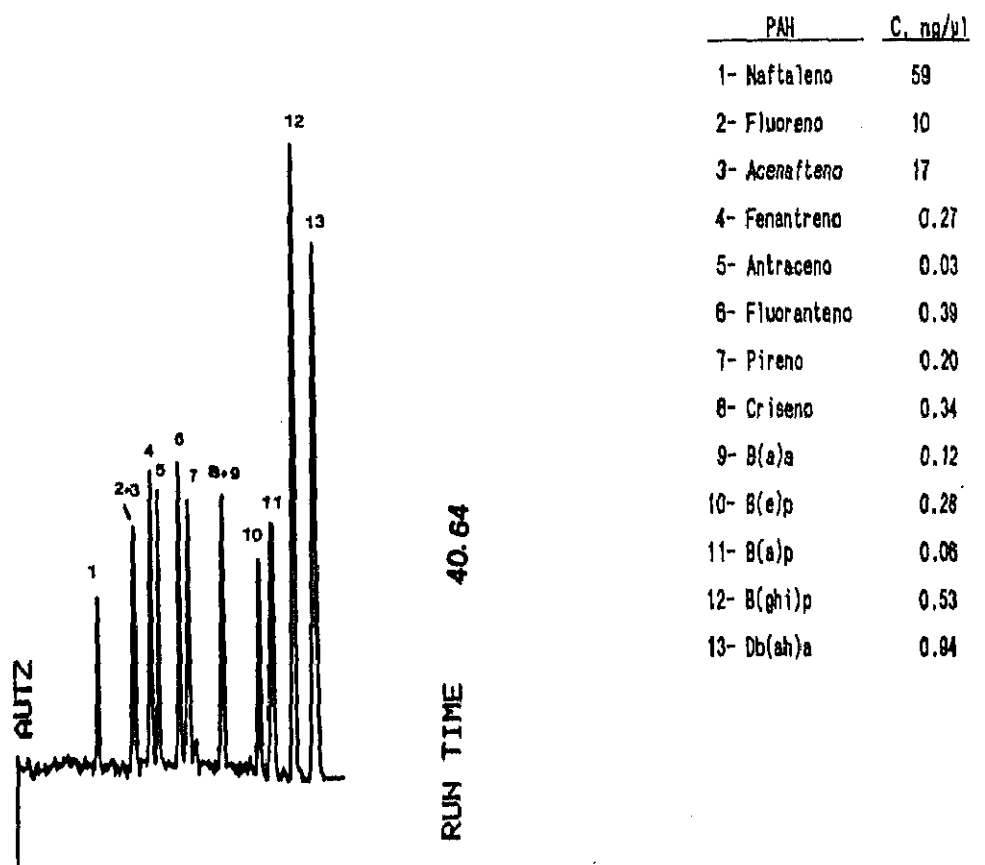


FIGURA 32: Cromatograma de HPLC de una muestra patrón de 13 PAHs.

Columna: Nucleosil C18; 5 μm (150 x 4.6 mm). Temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/agua, (véase tabla 28). Caudal: 1 ml/min. Detección fluorimétrica, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 254/375 nm. V. inyección: 20 μl.

3.2.2.2.2. Optimización de las variables cromatográficas

A continuación se desarrolla el estudio llevado a cabo para la separación por CLM de PAHs con fase móvil SDS/acetonitrilo. Para ello, por una parte se estudia la composición de la fase móvil y por otra el efecto que la concentración de SDS y el caudal ejercen sobre el área de los picos cromatográficos.

Acondicionamiento de la columna

En primer lugar para el acondicionamiento de la columna se ha utilizado el gradiente que figura en la tabla 29. Las concentraciones de SDS utilizadas han sido de 0.05, 0.10, 0.15 y 0.20 M en función de la concentración del tensioactivo utilizada en la fase móvil para la separación cromatográfica de los PAHs.

A) Composición de la fase móvil

Para ello se estudia por una parte la influencia que la concentración de SDS puede ejercer en la separación cromatográfica y por otra, el efecto que puede producir en dicha separación la adición de un alcohol como modificador de la fase móvil.

TABLA 29

Gradiente de acondicionamiento de la columna

Tiempo, min	A, %	B, %	C, %	Caudal ml/min
0.0	0	1	99	1
60.0	0	100	0	1
90.0	0	100	0	1
90.1	0	100	0	0.1
690.0	0	100	0	0.1
691.0	55	45	0	1
730.0	55	45	0	1

A: acetonitrilo
 B: SDS
 C: agua
 Temp.: 22°C

A.1. Concentración de solución acuosa de SDS

Para efectuar este estudio se ha utilizado como fase móvil el gradiente que figura en la tabla 30, caudal de 1 ml/min y temperatura de 22°C. Las concentraciones de SDS utilizadas en las diferentes experiencias realizadas han sido de 0.05, 0.10, 0.15 y 0.20 M. En todas las experiencias la concentración de SDS utilizada es la misma tanto en el gradiente de acondicionamiento de la columna como en el gradiente de la fase móvil.

TABLA 30
Gradiente de la fase móvil

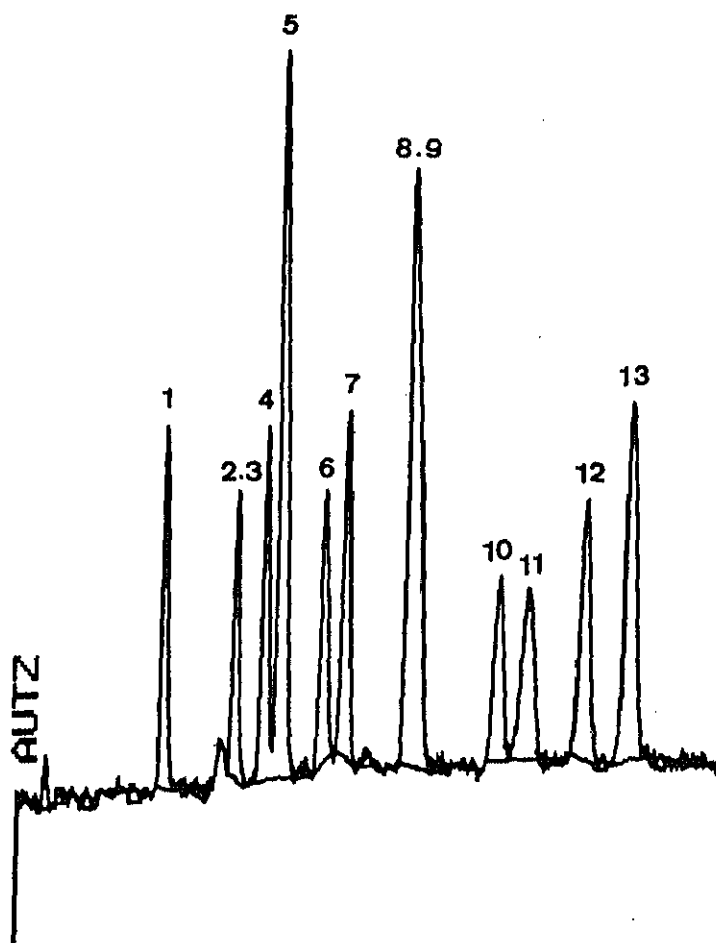
Tiempo, min	A, %	B, %
0.0	55	45
2.0	55	45
30.0	85	15
38.0	85	15
40.0	55	45

A: Acetonitrilo
B: SDS

A través de las experiencias realizadas se ha observado que la concentración de SDS utilizada no influye en el orden de elución de los PAHs, separándose 11 de los 13 estudiados y siendo además el orden de elución el mismo que cuando se utiliza como fase móvil acetonitrilo/agua, es decir: naftaleno, fluoreno o acenafteno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno o benzo(a)antraceno, benzo(e)pireno, benzo(a)pireno, benzo(ghi)perileno y dibenzo(ah)antraceno.

El hecho de que se obtenga el mismo resultado en la separación cromatográfica, en cuanto al número de componentes separados, con los dos tipos de fase móvil, acetonitrilo/agua y acetonitrilo/SDS, es debido lógicamente a la naturaleza de la fase estacionaria.

En las figuras 33 y 34 se presentan dos cromatogramas obtenidos tras el empleo de las fases móviles acetonitrilo/SDS 0.10 y 0.20 M respectivamente y caudal 1 ml/min.

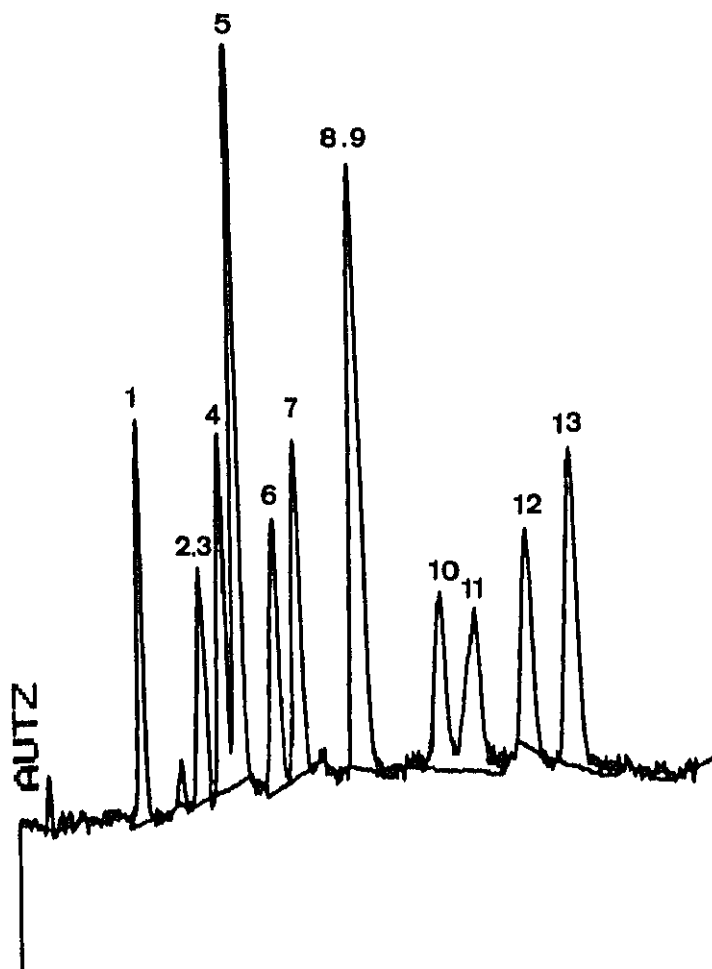


RUN TIME 33.95

PAH	C. ng/μl
1- Naftaleno	35
2- Fluoreno	17
3- Acenafteno	8.8
4- Fenantreno	0.21
5- Antraceno	0.05
6- Fluoranteno	0.26
7- Pireno	0.20
8- Criseno	0.50
9- B(a)a	0.07
10- B(e)p	0.22
11- B(a)p	0.05
12- B(ghi)p	0.26
13- Db(h)a	0.62

FIGURA 33 : Cromatograma de HPLC de una muestra patrón de 13 PAHs.

Columna: Nucleosil C18; 5 μm (150 x 4.6 mm). Temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/SDS 0.10 M (véase tabla 30). Caudal: 1 ml/min. Detección fluorimétrica, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 254/375 nm. V. inyección: 20 μl.



PAH	C, ng/μl
1- Naftaleno	35
2- Fluoreno	17
3- Acenafteno	8.8
4- Fenantreno	0.21
5- Antraceno	0.03
6- Fluoranteno	0.28
7- Pireno	0.21
8- Criseno	0.51
9- B(a)a	0.0
10- B(e)p	0.2
11- B(a)p	0.0
12- B(ghi)p	0.2
13- Db(ah)a	0.6

FIGURA 34 : Cromatograma de HPLC de una muestra patrón de 13 PAHs.

Columna: Nucleosil C18; 5 μm (150 x 4.6 mm). Temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/SDS 0.20 M (véase tabla 30). Caudal: 1 ml/min. Detección fluorimétrica, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 254/375 nm. V. inyección: 20 μl.

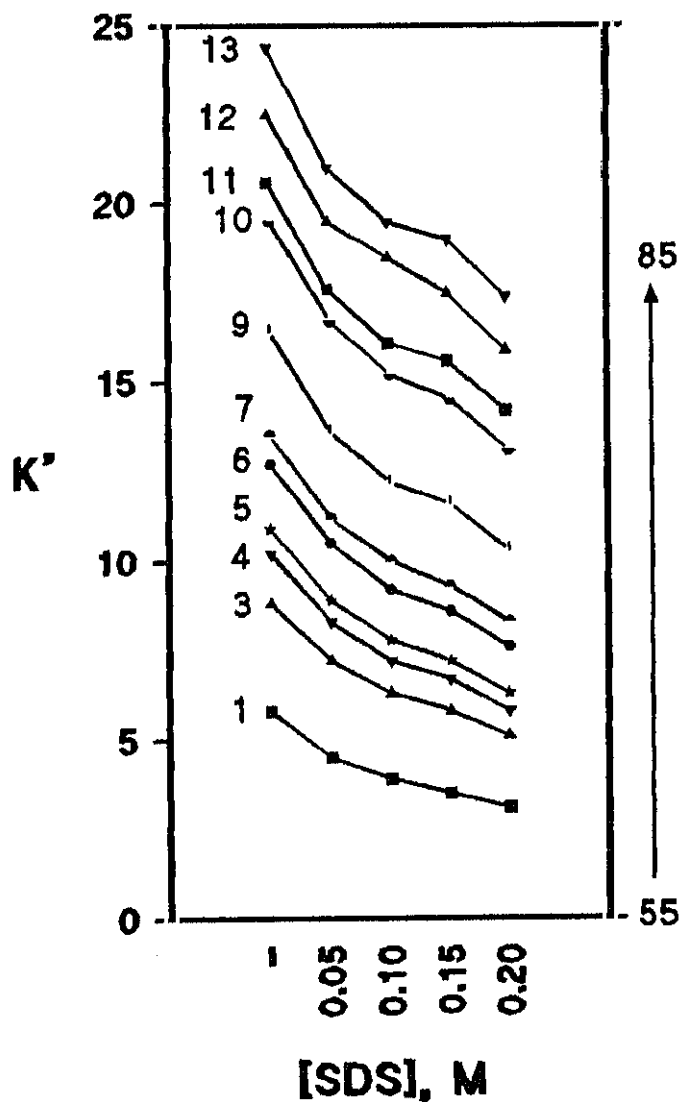
Cuando se utiliza fase móvil acetonitrilo/SDS, los tiempos de retención de los PAHs son inferiores a los obtenidos con fase móvil acetonitrilo/agua, lo que conlleva a un menor consumo de acetonitrilo en la separación cromatográfica. Igualmente se ha observado que el tiempo de análisis disminuye conforme aumenta la concentración de SDS. Así por ejemplo los tiempos de retención del dibenzo(ah)antraceno, último en eluir, son de 31.85, 29.74, 29.00 y 26.85 minutos para las concentraciones de 0.05, 0.10, 0.15 y 0.20 M de SDS respectivamente.

En la figura 35 queda reflejada la influencia que la concentración de SDS de la fase móvil ejerce sobre la retención de los PAHs. Este efecto puede justificar la existencia de micelas en la fase móvil a pesar del elevado contenido de acetonitrilo. Según Cline Love (285), cuando aumenta la concentración micelar y por consiguiente el número de micelas de la fase móvil se produce un decrecimiento en los tiempos de retención de los analitos y cuando la concentración de tensioactivo iónico es inferior a la CMC se produce el efecto contrario, es decir aumentan los tiempos de retención.

A.2. Efecto de la adición de alcohol como modificador de la fase móvil

Por otra parte, con el fin de mejorar la resolución cromatográfica se han efectuado diferentes experiencias introduciendo en la fase móvil un alcohol de bajo peso molecular, propanol o metanol, como segundo modificador orgánico. Para ello se utiliza el gradiente que figura en la tabla 31, temperatura de la columna de 22°C y caudal de

1 ml/min.



PAH	C. ng/W
1- Naftaleno	35
2- Fluoreno	17
3- Acenafteno	8.6
4- Fenantreno	0.2
5- Antraceno	0.0
6- Fluoranteno	0.2
7- Pireno	0.2
8- Criseno	0.5
9- B(a)a	0.0
10- B(e)p	0.2
11- B(a)p	0.0
12- B(ghi)p	0.2
13- Db(ah)a	0.6

FIGURA 35: Efecto de la concentración de SDS sobre la retención de los PAHs

Con propanol y utilizando porcentajes del 5-10% según se indica en la tabla 31, disminuye la resolución para las parejas fenantreno-antraceno y benzo(e)pireno-benzo(a)pireno, si bien al ser más fuerte que el acetonitrilo disminuye el tiempo de análisis. Así por ejemplo el tiempo de retención del dibenzo(ah)antraceno, último en eluir, es de 29.38 minutos como puede observarse en el cromatograma de la figura 36, donde se ha empleado como fase móvil un gradiente de acetonitrilo/SDS 0.10 M/propanol (A/B/C; donde $x = 5$) y caudal 1 ml/min.

TABLA 31

Gradiente de la fase móvil utilizando un alcohol como modificador

Tiempo, min	A, %	B, %	C, %
0.0	55 - x	45	x
2.0	55 - x	45	x
30.0	85 - x	15	x
38.0	85 - x	15	x
40.0	55 - x	45	x

A: acetonitrilo
 B: SDS = 0.10; 0.20 M
 x: Propanol o metanol
 Temp.: 22°C

Cuando se utiliza metanol como segundo modificador orgánico en porcentajes de 5, 10, 15 y 20%, según se indica en la tabla 31, la resolución disminuye para la pareja fenantreno-antraceno, observándose además deriva en la línea base con el consiguiente aumento del tiempo de análisis debido a que el metanol es menos fuerte que el acetonitrilo. Así por ejemplo puede observarse en el

cromatograma de la figura 37, que el tiempo de retención del dibenzo(ah)antraceno, último en eluir, es de 34.39 minutos para la concentración 0.10 M de SDS y el 15% de metanol.

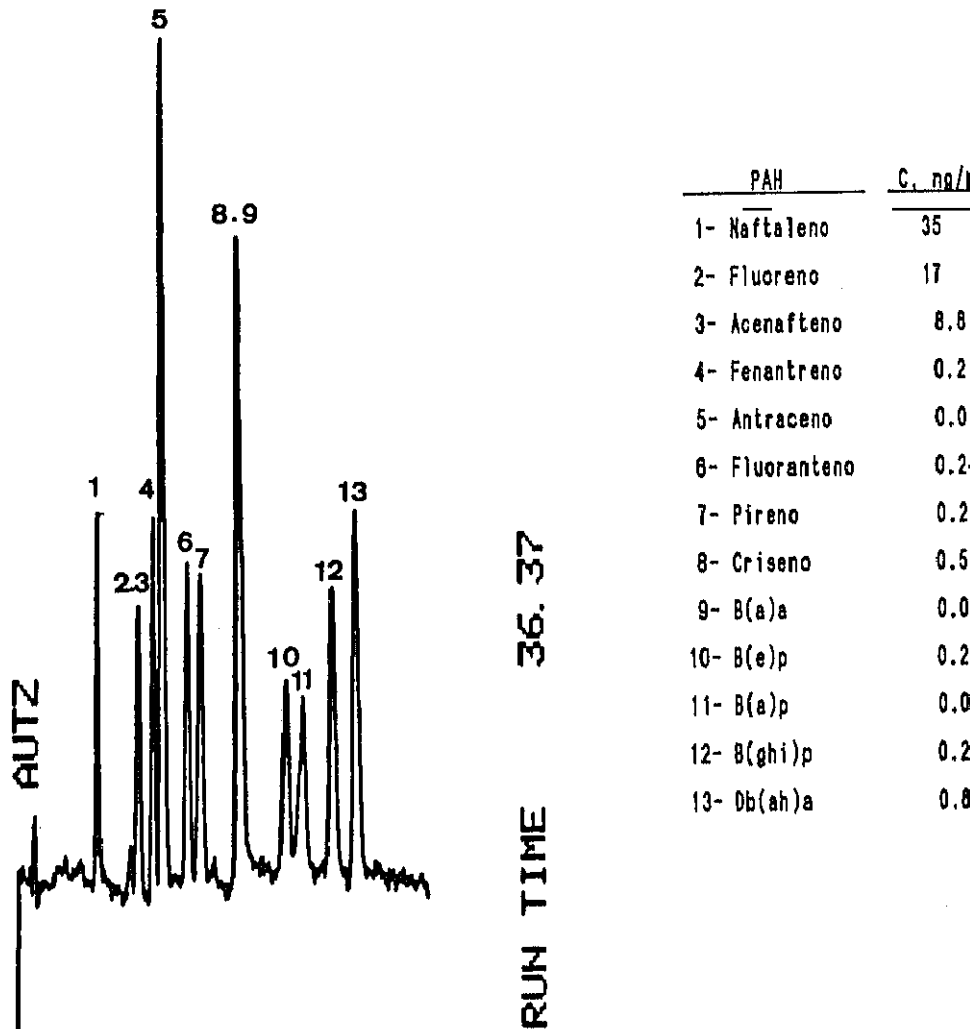


FIGURA 36 : Cromatograma de HPLC de una muestra patrón de 13 PAHs.

Columna: Nucleosil C18; 5 μ m (150 x 4.6 mm). Temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/SDS 0.1 M/propanol (véase tabla 31; x=5). Caudal: 1 ml/min. Detección fluorimétrica, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 254/375 nm. V. inyección: 20 μ l.

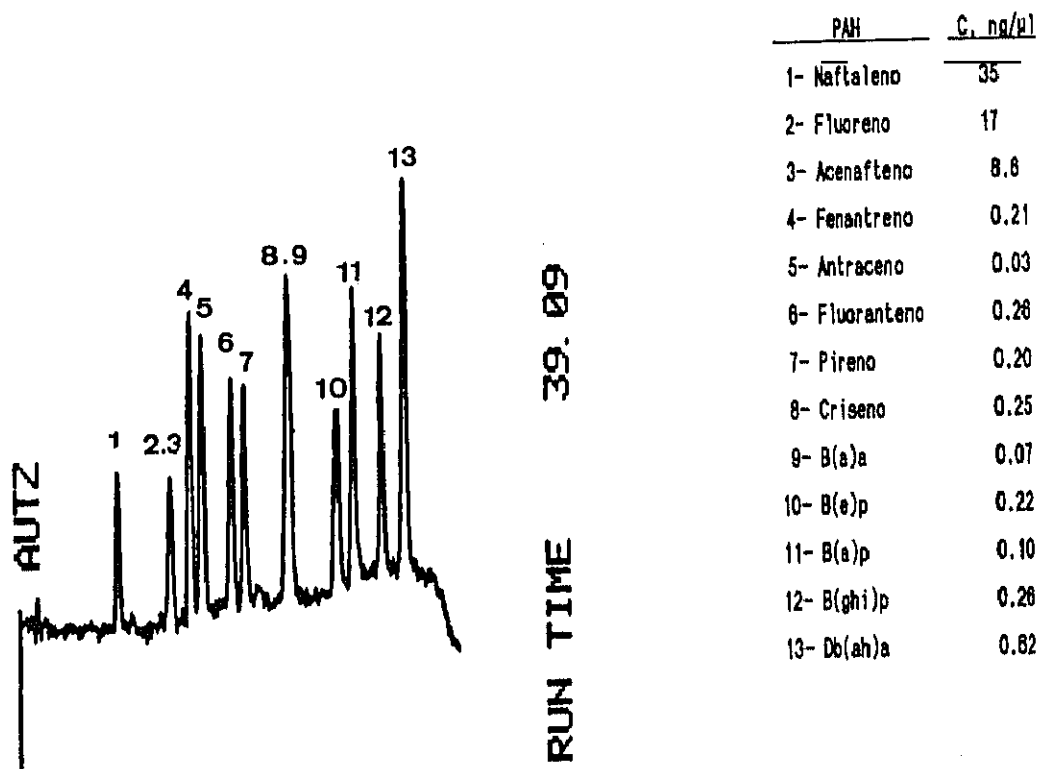


FIGURA 37 : Cromatograma de HPLC de una muestra patrón de 13 PAHs.

Columna: Nucleosil C18; 5 μm (150 x 4.6 mm). Temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/SDS 0.1 M/metanol (véase tabla 31; x=15). Caudal: 1 ml/min. Detección fluorimétrica, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 254/375 nm. V. inyección: 20 μl.

Por otra parte se ha observado que la temperatura no afecta significativamente a la separación cromatográfica en el intervalo de 18 a 25°C. Es importante indicar que debido al elevado porcentaje de acetonitrilo utilizado, no es necesario termostatar la columna cromatográfica a temperatura elevada como habitualmente ocurre cuando se trabaja en CLM.

B) Influencia de la concentración de SDS y caudal sobre el área de los picos cromatográficos

Con el fin de mantener el mismo tiempo de análisis e igual al obtenido cuando se utiliza como fase móvil acetonitrilo/agua se realizan una serie de experiencias. Para ello las concentraciones de SDS utilizadas en la fase móvil han sido 0.10, 0.15 y 0.20 M y los caudales de 0.80, 0.72, y 0.65 ml/min respectivamente. Según se observa en la figura 38 se obtienen en general, mayores áreas de los picos cromatográficos y por consiguiente mayor sensibilidad cuando la concentración de SDS utilizada es de 0.20 M y caudal de 0.65 ml/min. En estas condiciones los valores de las áreas son para la mayoría de los PAHs el doble que cuando se utiliza fase móvil acetonitrilo/agua y caudal de 1 ml/min.

Este efecto puede confirmar de nuevo la existencia de micelas en la fase móvil.

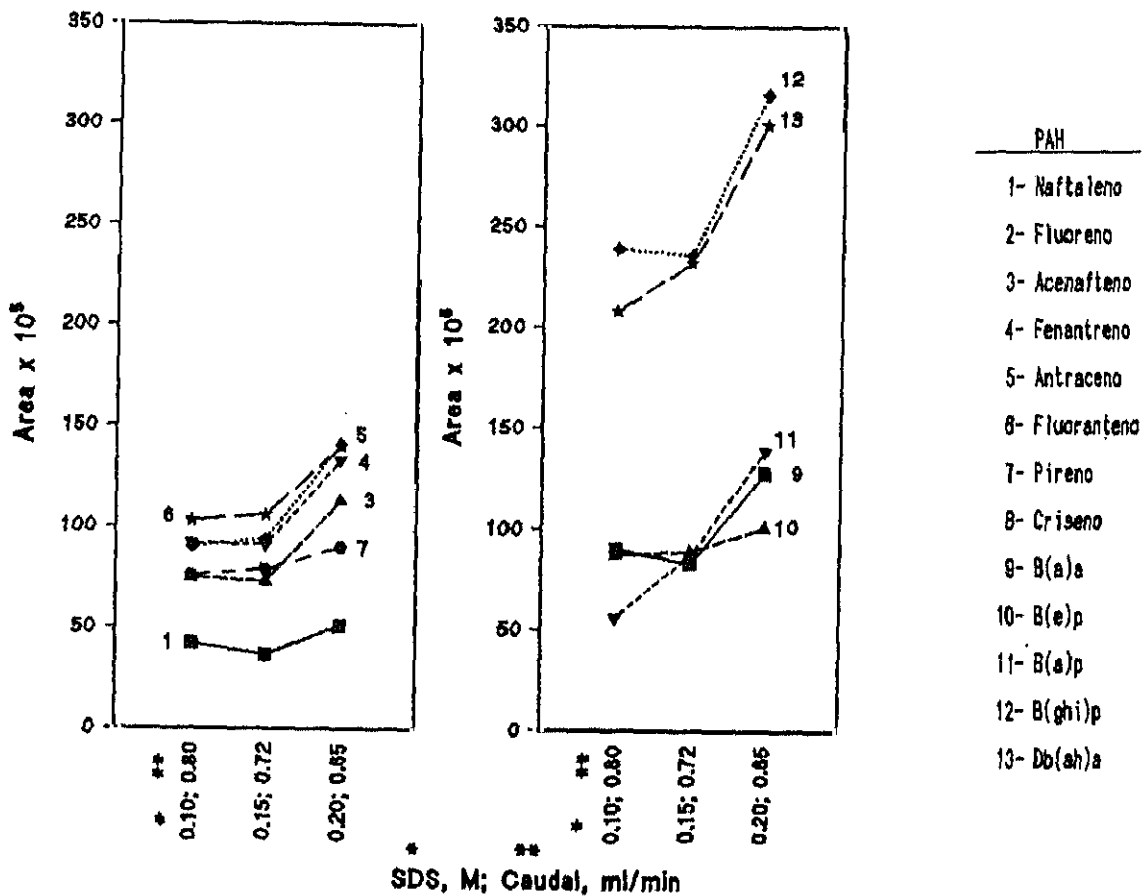


FIGURA 38: Influencia de la concentración de SDS y caudal sobre el área de los picos cromatográficos. Las concentraciones de los PAHs se especifican en la figura 35.

C) Condiciones óptimas

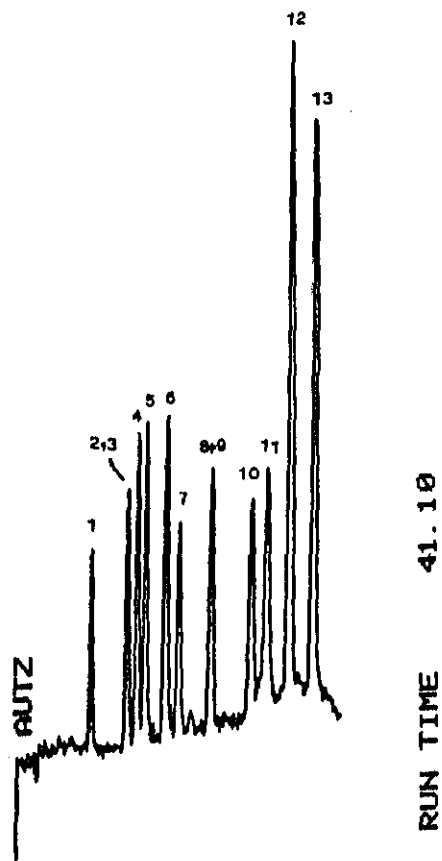
Tomando como base este estudio y teniendo en cuenta que la adición de un alcohol como segundo modificador orgánico de la fase móvil no ofrece mejoras en la resolución cromatográfica, las condiciones óptimas de trabajo con fines a la cuantificación de los PAHs son las siguientes:

- Fase móvil gradiente de acetonitrilo/SDS 0.20 M tabla 30.
- Caudal de 0.65 ml/min.
- Temperatura de 22°C.
- Columna acondicionada según se indica en tabla 29

En estas condiciones se ha obtenido el cromatograma que se indica en la figura 39.

3.2.2.2.3. Características analíticas

La determinación de las características analíticas se ha llevado a cabo siguiendo el procedimiento descrito en la parte experimental, apartado 2.4.2. Con fines comparativos también se indican las características analíticas cuando se utiliza la fase móvil acetonitrilo/agua.



PAH	C, ng/μl
1- Naftaleno	59
2- Fluoreno	10
3- Acenafteno	17
4- Fenantreno	0.27
5- Antraceno	0.03
6- Fluoranteno	0.39
7- Pireno	0.20
8- Criseno	0.34
9- B(a)a	0.12
10- B(e)p	0.28
11- B(a)p	0.06
12- B(ghi)p	0.53
13- Db(ah)a	0.94

FIGURA 39: Cromatograma de HPLC de una muestra patrón de 13 PAHs.

Columna: Nucleosil C18; 5 μm (150 x 4.6 mm). Temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/SDS, (véase tabla 30). Caudal: 0.65 ml/min. Detección fluorimétrica, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 254/375 nm. V. inyección: 20 μl.

Calibrados

A continuación se representan los calibrados de cada uno de los PAHs. Los de la derecha (b) corresponden a los obtenidos con fase móvil acetonitrilo/SDS 0.20 M y caudal 0.65 ml/min y, los de la izquierda (a) los obtenidos con la fase móvil acetonitrilo/agua y caudal 1 ml/min.

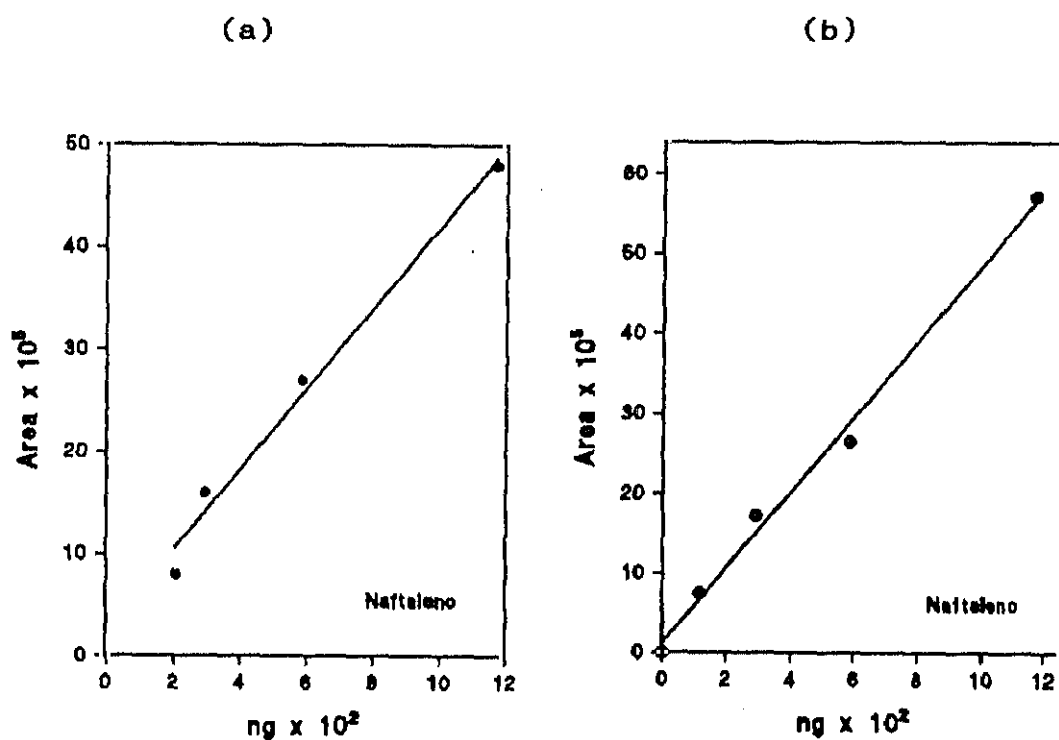


FIGURA 40: Calibrados del naftaleno.

Condiciones: (a), véase figura 32; (b), véase figura 39.

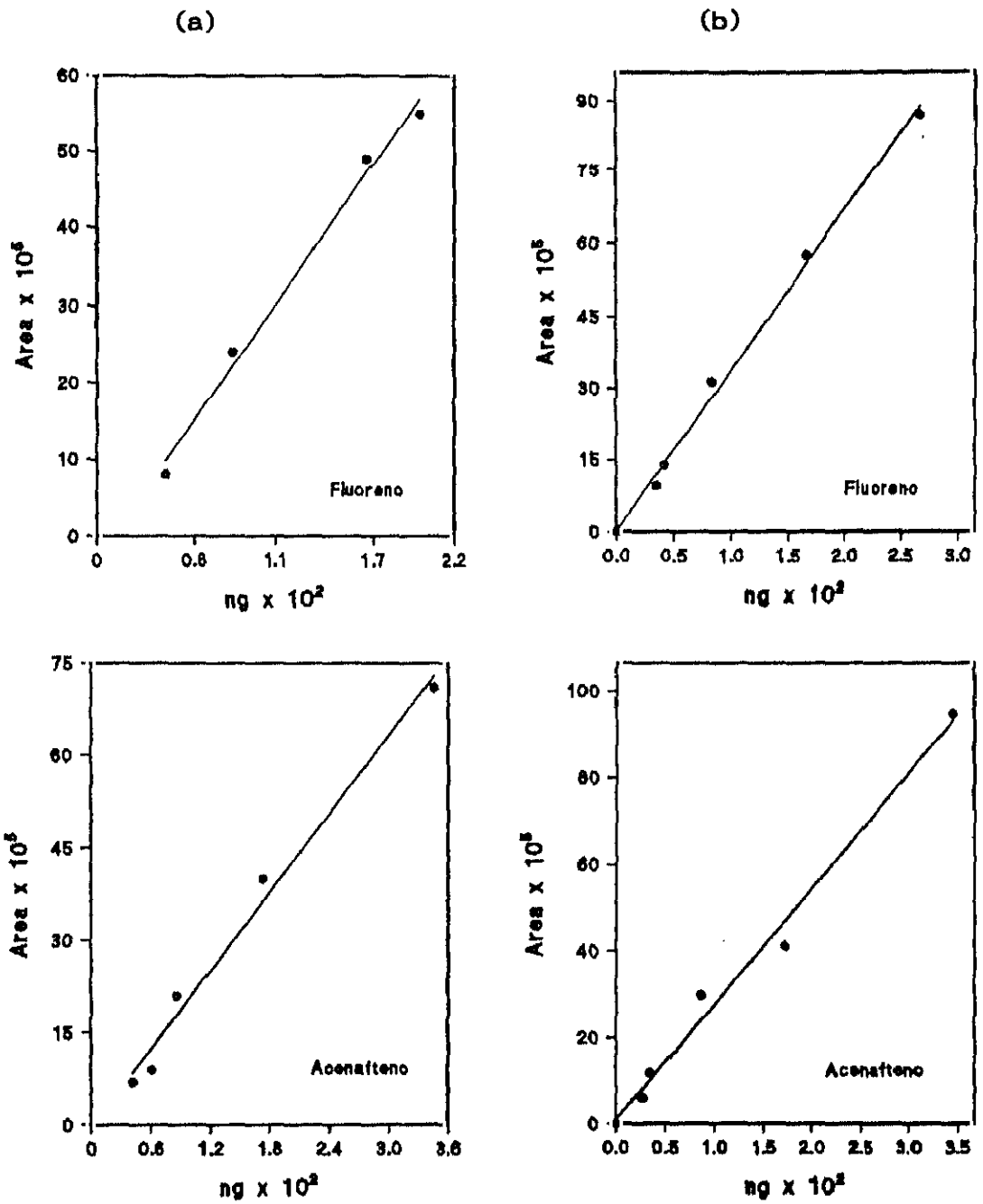


FIGURA 41: Calibrados del fluoreno y acenafteno.
 Condiciones: (a), véase figura 32; (b), véase figura 39.

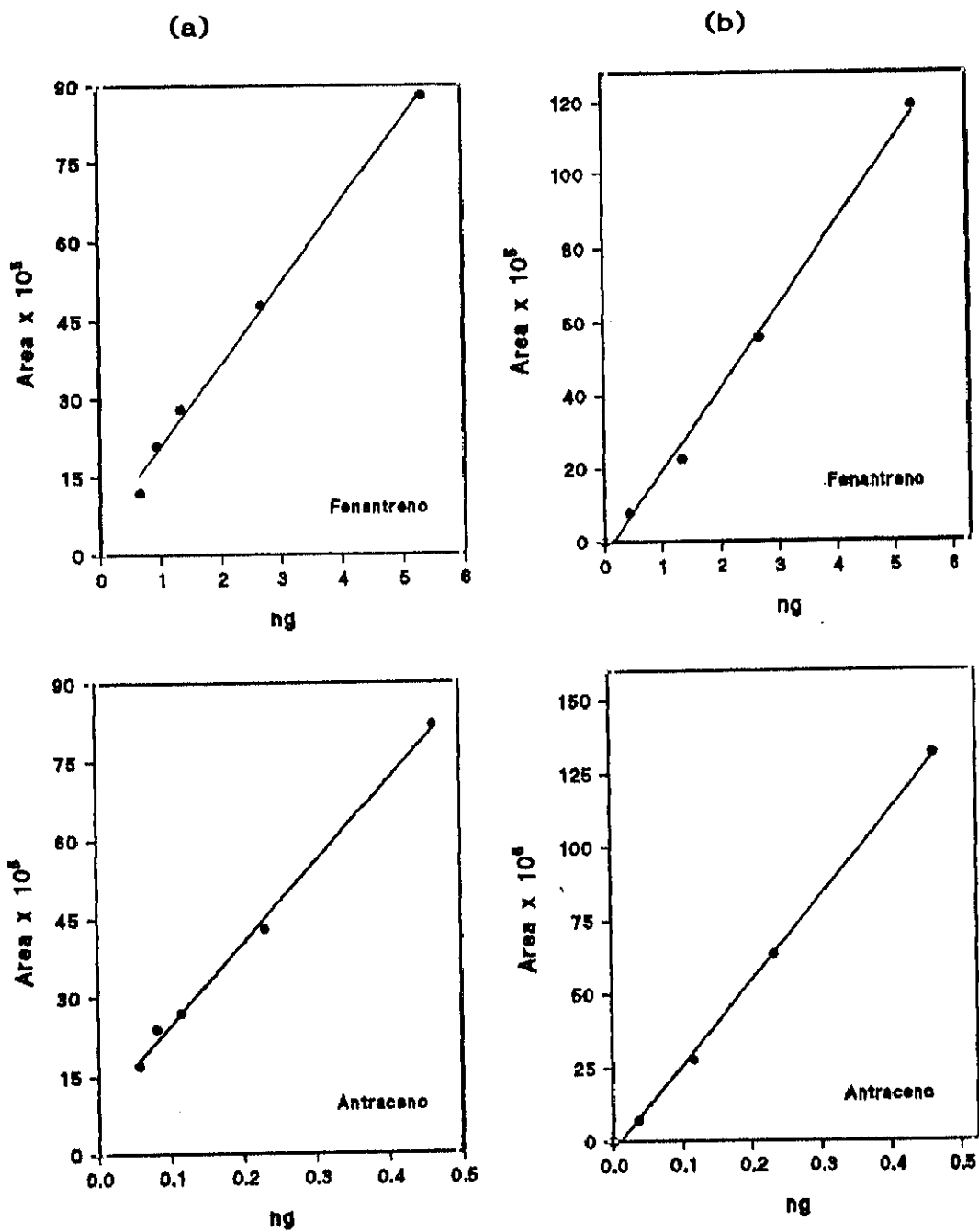


FIGURA 42: Calibrados del fenantreno y antraceno.
 Condiciones: (a), véase figura 32; (b), véase figura 39.

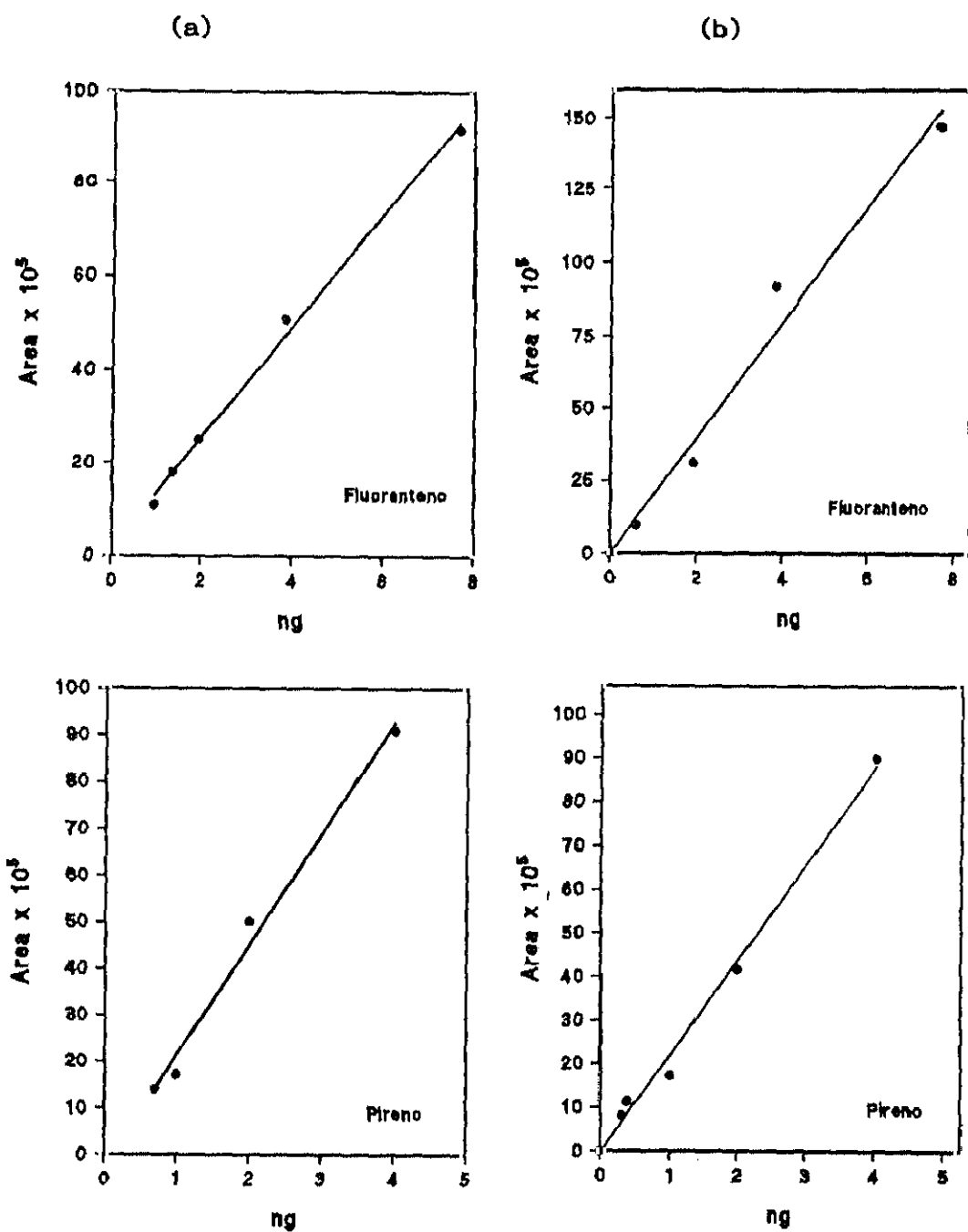


FIGURA 43: Calibrados del fluoranteno y pireno.
 Condiciones: (a), véase figura 32; (b), véase figura 39.

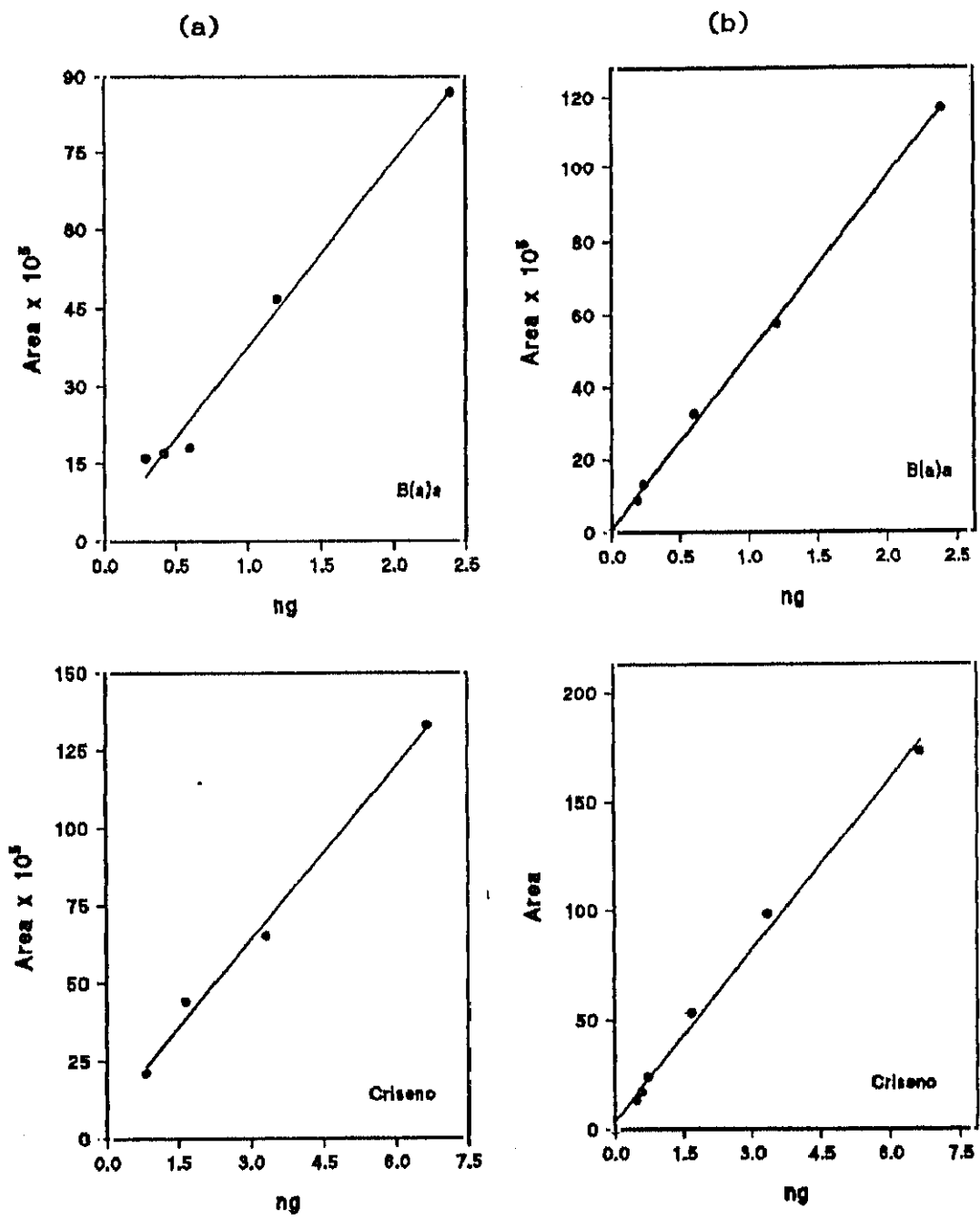


FIGURA 44: Calibrados del benzo(a)antraceno y criseno. Condiciones: (a), véase figura 32; (b), véase figura 39.

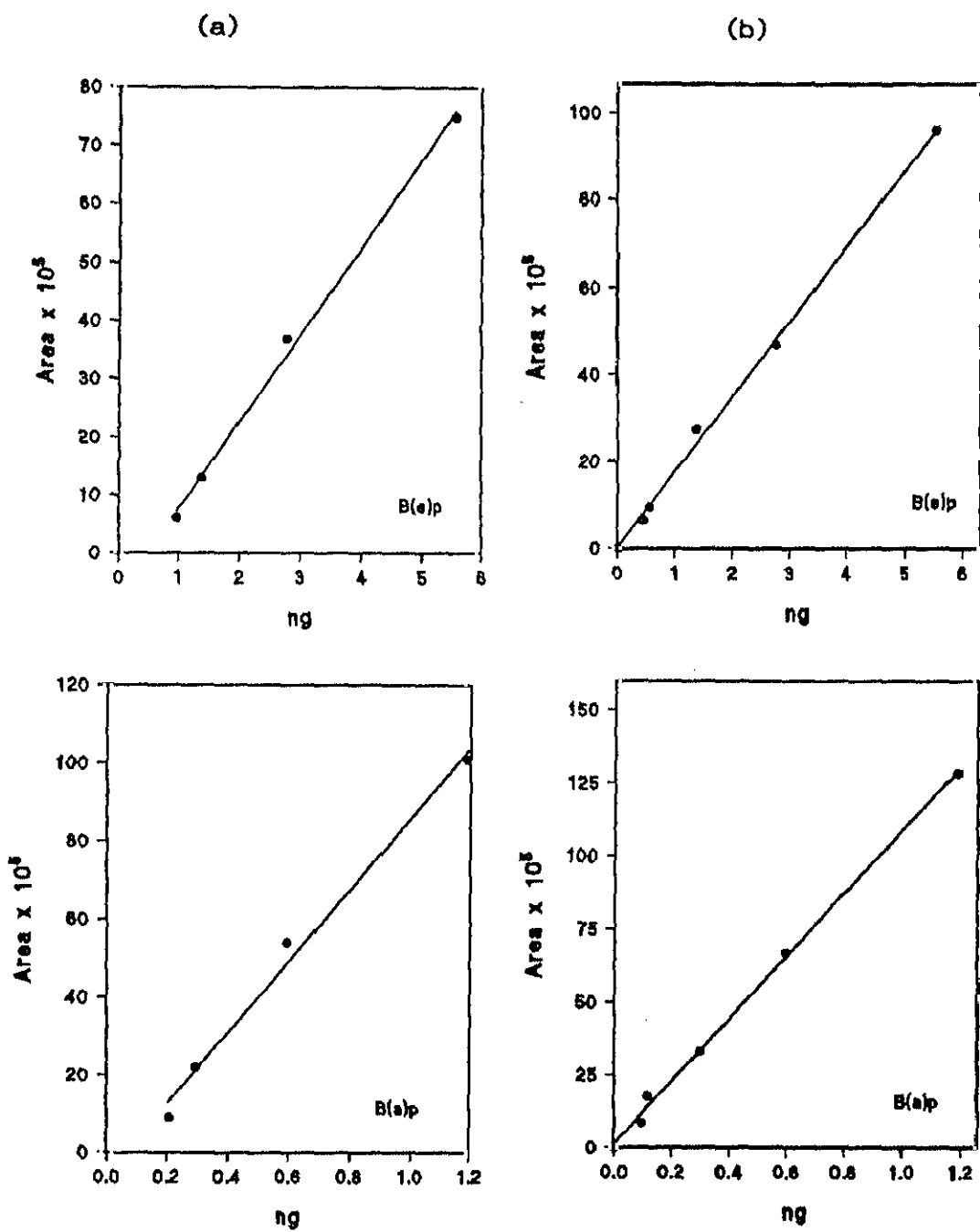


FIGURA 45: Calibrados del benzo(e)pireno y bezo(a)pireno.
 Condiciones: (a), véase figura 32; (b), véase figura 39.

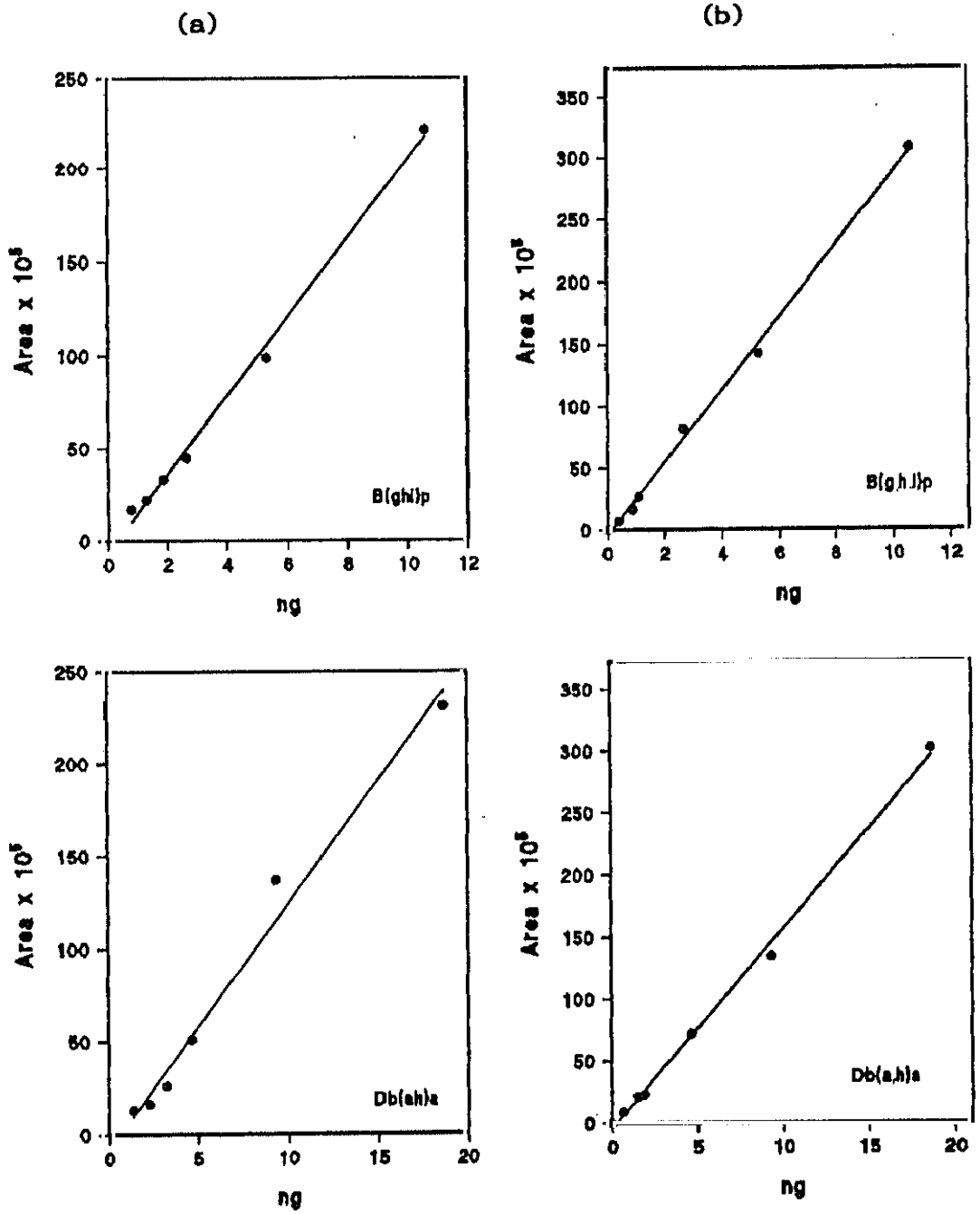


FIGURA 46: Calibrados del benzo(ghi)perileno y dibenzo(ah)antraceno. Condiciones: (a), véase figura 32; (b), véase figura 39.

Límites de detección

En la tabla 32 se especifican los límites de detección (LD) experimentales calculados teniendo en cuenta la relación señal/ruido de fondo, $LD = 3 S/N$ (S señal; N ruido). En dicha tabla figuran los límites de detección calculados cuando la cuantificación de PAHs se lleva a cabo con la fase móvil acetonitrilo/SDS 0.2 M (LD_1) y cuando se utiliza como fase móvil acetonitrilo/agua (LD_2). Puede observarse que los límites de detección son inferiores cuando la fase móvil es acetonitrilo/SDS 0.2 M, dichos valores varían desde 0.002 ng/ μ l para el antraceno hasta 5,86 ng/ μ l para el naftaleno.

En la tabla 32 también figuran los factores de sensibilización expresados por la relación $(LD_2/LD_1) \times 100$, siendo todos ellos superiores al 100%. Esto significa que la determinación cromatográfica de PAHs es más sensible cuando se utiliza fase móvil acetonitrilo/SDS 0.2 M.

Tiempos de retención y precisión en la cuantificación

En la tabla 33 se indican los tiempos de retención de los PAHs cuando la determinación cromatográfica se lleva a cabo con acetonitrilo/SDS como fase móvil y caudal de 0.65 ml/min. También están indicados los límites superiores de linealidad estudiados, siendo estos del orden de 10 a 30 veces superiores a los límites de detección.

TABLA 32

Límites de detección y factores de sensibilización de los PAHs

Nº	PAHs	LD ₁ , ng/μl	LD ₂ , ng/μl	F.S. (LD ₂ /LD ₁)x100
1	Naftaleno	5.86	10.2	180
2	Fluoreno	1.74	2.08	120
3	Acenafteno	1.38	2.11	150
4	Fenantreno	0.022	0.03	150
5	Antraceno	0.002	0.003	150
6	Fluoranteno	0.031	0.047	150
7	Pireno	0.016	0.035	220
8	Criseno	0.024	0.042	170
9	B(a)a	0.009	0.015	150
10	B(e)p	0.022	0.049	220
11	B(a)p	0.005	0.010	220
12	B(ghi)p	0.019	0.039	210
13	Db(ah)a	0.033	0.69	210

LD = 3 S/N (experimental)

LD₁: acetonitrilo/SDS 0.20 M; caudal 0.65 ml/min

LD₂: acetonitrilo/agua; caudal 1 ml/min

F.S.: factor de sensibilización

En dicha tabla también aparecen las desviaciones estándar relativas siendo éstas inferiores al 7.5% para todos los PAHs, a los niveles de concentraciones de 0.01-26 ng/μl correspondientes a los puntos medios de los calibrados, con coeficientes de correlación próximos a 0.999.

TABLA 33

Características en la determinación cromatográfica de PAHs con fase móvil acetonitrilo/SDS y caudal 0.65 ml/min

Nº	PAHs	t_r , min	Límite superior estudiado, ng/ μ l	\bar{x} , ng/ μ l	S_r , %
1	Naftaleno	9.24	59	26	3.1
2	Fluoreno	13.68	10	5.8	2.3
3	Acenafteno	13.83	17	6.5	5.0
4	Fenantreno	15.13	0.27	0.12	1.2
5	Antraceno	16.18	0.03	0.01	0.6
6	Fluoranteno	18.54	0.39	0.16	4.1
7	Pireno	20.20	0.20	0.06	6.0
8	Criseno	23.40	0.34	0.14	4.6
9	B(a)a	23.60	0.12	0.06	7.4
10	B(e)p	29.03	0.28	0.15	5.1
11	B(a)p	31.04	0.06	0.03	4.2
12	B(ghi)p	33.86	0.53	0.25	1.3
13	Db(ah)a	36.81	0.94	0.42	0.1

n = 4

Análogamente en la tabla 34 también se expresan las características del método cuando la determinación se lleva a cabo con acetonitrilo/agua y caudal de 1 ml/min. Puede observarse que tanto los intervalos de linealidad estudiados como las desviaciones estándar relativas son del mismo orden a las obtenidas con la fase móvil actonitrilo/SDS 0.2 M.

TABLA 34

Características en la determinación cromatográfica de PAHs con fase móvil acetonitrilo/agua y caudal 1 ml/min

Nº	PAHs	t_r , min	Límite superior estudiado, ng/ μ l	\bar{x} , ng/ μ l	S_r , %
1	Naftaleno	9.85	59	28	2.6
2	Fluoreno	14.01	10	6.2	6.9
3	Acenafteno	14.24	17	8.0	0.3
4	Fenantreno	16.27	0.27	0.13	0.8
5	Antraceno	17.27	0.03	0.02	1.5
6	Fluoranteno	19.88	0.39	0.20	1.2
7	Pireno	21.02	0.20	0.09	3.3
8	Criseno	24.92	0.34	0.14	9.5
9	B(a)a	25.18	0.12	0.06	3.8
10	B(e)p	29.76	0.28	0.14	5.2
11	B(a)p	31.28	0.06	0.04	5.0
12	B(ghi)p	34.07	0.53	0.24	3.8
13	Db(ah)a	36.86	0.94	0.50	5.4

n = 4

Selectividad

Con el fin de poder apreciar con más facilidad la notable selectividad que se obtiene en la separación cromatográfica de PAHs con fase móvil acetonitrilo/SDS frente a cuando dicha separación se efectúa con acetonitrilo/agua, en la figura 47 se indican los cromatogramas correspondientes a la separación de estos

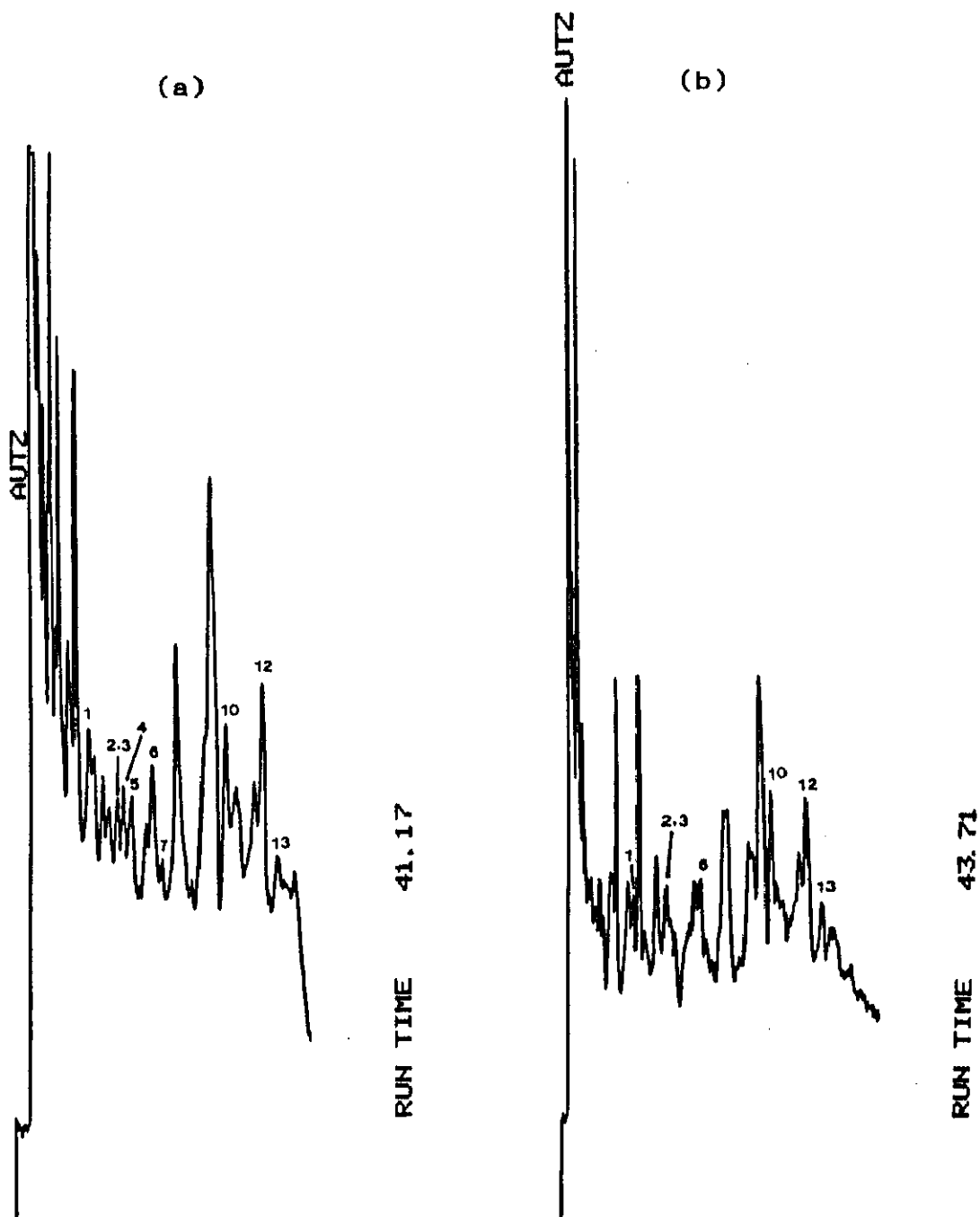


FIGURA 47 (a y b): Cromatogramas de HPLC de una muestra de aire urbano de la ciudad de Madrid (M 4)

Condiciones experimentales: véase figura 39 para el cromatograma (a) y figura 32 para el cromatograma (b)

compuestos en una muestra de aire urbano. El cromatograma (a) se ha obtenido con la fase móvil acetonitrilo/SDS y el (b) con acetonitrilo/agua. Como queda reflejado en la figura se obtiene mayor selectividad y sensibilidad, tanto para los PAHs como para otros componentes no identificados en la muestra, cuando se utiliza la fase móvil acetonitrilo/SDS. Así, por ejemplo en el cromatograma (a) se identifican los picos cromatográficos 4, 5 y 7 correspondientes a los PAHs fenantreno, antraceno y pireno, hecho que no ocurre en el cromatograma (b).

También cabe destacar la alteración en el orden de elución en algunos de los componentes de la muestra analizada, que si bien no corresponde a los PAHs si es un hecho que puede ocurrir en la separación cromatográfica por CLM frente a cuando esta se efectúa por HPLC en fase reversa convencional.

Finalmente es importante indicar que la utilización de la fase móvil acetonitrilo/SDS para la separación y cuantificación de PAHs presenta las ventajas siguientes: mayor sensibilidad y selectividad, menor toxicidad y menor costo.

3.2.3. Separación de PAHs por HPLC con fase móvil hidro-orgánica

3.2.3.1. Columna Hypersil Green PAH

Teniendo en cuenta que por CLM, según se ha podido comprobar en el estudio desarrollado anteriormente, no es posible la separación cromatográfica de los 13 PAHs, siendo éste uno de los objetivos planteados en esta memoria, se lleva a cabo el estudio cromatográfico utilizando como fase estacionaria una columna específica de PAHs, de aparición reciente en el mercado y de la que no existe referencia alguna en la revisión bibliográfica efectuada, además de resultar más económica que las ya existentes con características similares.

3.2.3.1.1. Optimización de las variables cromatográficas

Con el fin de conseguir buena resolución de los PAHs, el mínimo tiempo de análisis y alta sensibilidad para su cuantificación se realiza previamente el estudio de optimización de las variables experimentales.

Las variables cromatográficas estudiadas han sido, por una parte el caudal y gradiente de la fase móvil y por otra, el programa de las parejas de longitudes de onda de excitación/emisión, para la detección fluorimétrica de los PAHs.

Caudal y gradiente de la fase móvil

Para el estudio del caudal y gradiente de la fase móvil se ha utilizado el detector de filtros Waters 420 por su fácil manejo además de permitir la detección de todos los PAHs con filtros de 254 nm (excitación) y de 375 nm (emisión).

La fase móvil utilizada ha sido acetonitrilo/agua, seleccionada por las razones indicadas en el estudio anterior (apartado 3.2.2.2.1.).

En primer lugar se realizan una serie de experiencias en las que se varía el caudal manteniendo constantes el resto de las variables cromatográficas, temperatura ambiente de 22°C y gradiente de la fase móvil indicado en la tabla 35, recomendado por la casa comercial para esta columna.

TABLA 35

Gradiente lineal de la fase móvil

Tiempo, min	A, %	B, %
0.0	50	50
5.0	50	50
25.0	100	-

A: acetonitrilo

B: agua

Las figuras 48 y 49 muestran los cromatogramas correspondientes a la separación de los 13 PAHs. Las

concentraciones de los PAHs son las mismas en los dos casos. La figura 48 se ha obtenido con el caudal de 1 ml/min y la figura 49 con caudal de 2 ml/min. Se optimiza el caudal de 1 ml/min teniendo en cuenta que a pesar de ser mayor el tiempo de análisis, la sensibilidad es bastante

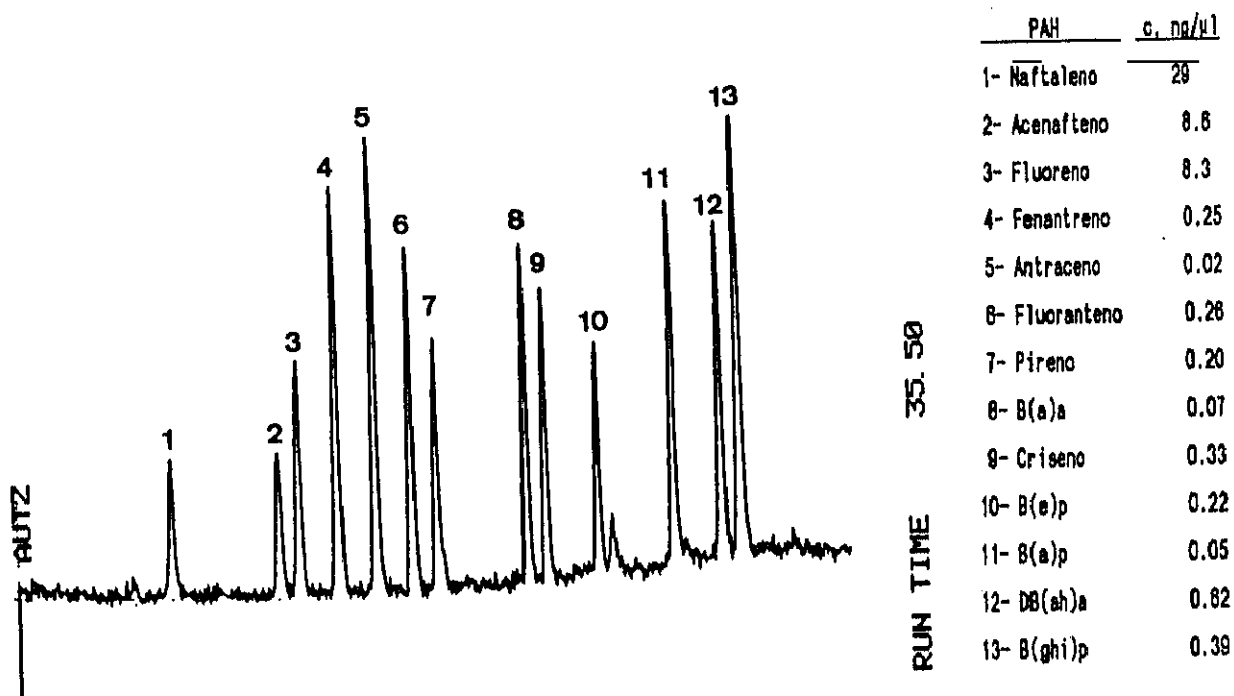


FIGURA 48 : Cromatograma de HPLC de una muestra patrón de 13 PAHs.

Columna: Hypersil Green PAH (100 x 4,6 mm). Temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/agua, (véase tabla 35). Caudal: 1 ml/min. Detección fluorimétrica, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 254/375 nm. V. inyección: 20 μ l.

superior en este caso, a la par que se mejora la resolución de los dos últimos picos cromatográficos correspondientes al dibenzo(ah)antraceno y benzo(ghi)perileno, frente a cuando se utiliza el caudal de 2 ml/min.

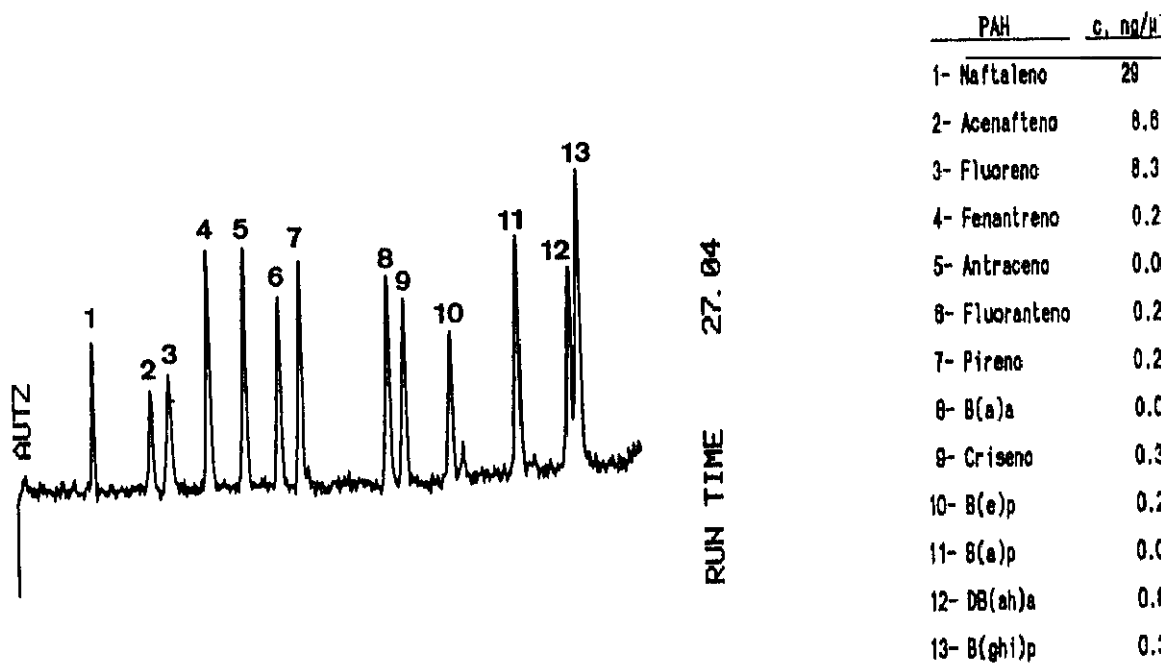


FIGURA 49 : Cromatograma de HPLC de una muestra patrón de 13 PAHs.

Columna: Hypersil Green PAH (100 x 4.6 mm). Temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/agua, (véase tabla 35). Caudal: 2 ml/min. Detección fluorimétrica, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 254/375 nm. V. inyección: 20 μ l.

Por otra parte es importante resaltar que la utilización del caudal de 1 ml/min conlleva a un ahorro de fase móvil del orden del 60%.

Para la selección del gradiente de la fase móvil se han efectuado varias pruebas termostatando la columna a 22°C y caudal de 1 ml/min. En la tabla 36 se indica el gradiente optimizado en este estudio. En la figura 50 se muestra el cromatograma obtenido con este gradiente. Puede observarse que los tiempos de retención son inferiores a los que se obtienen aplicando el gradiente de la tabla 35 (figura 48).

TABLA 36
Gradiente lineal de la fase móvil

Tiempo, min	A, %	B, %
0.0	50	50
3.0	50	50
15.0	78	22
23.0	100	-
35.0	100	-
37.0	50	50

A: acetonitrilo
B: agua
Caudal: 1 ml/min

Programa de longitudes de onda de excitación/emisión

Con el fin de conseguir la máxima sensibilidad en la detección fluorimétrica, se realiza el estudio para la

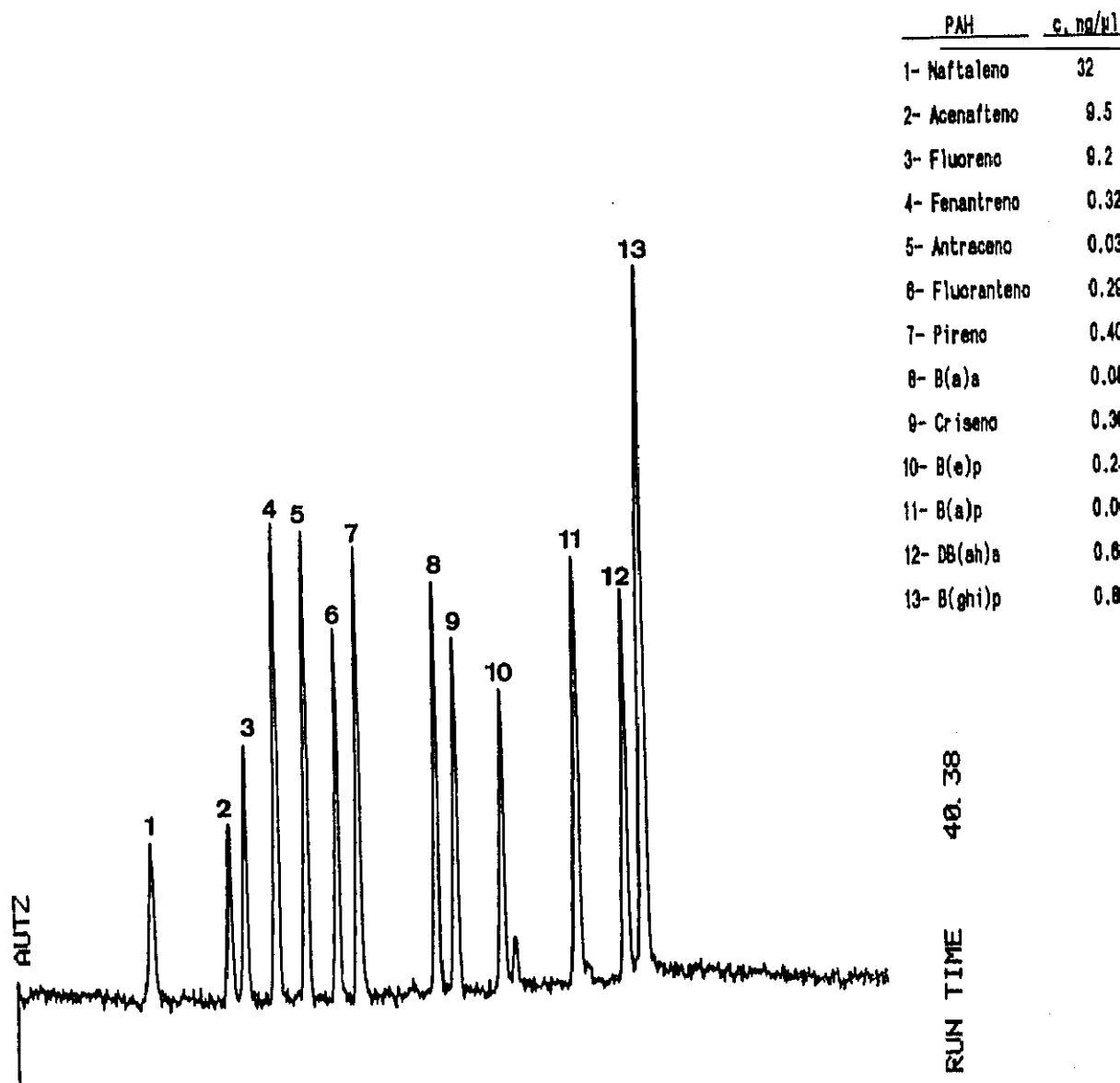


FIGURA 50: Cromatograma de HPLC de una muestra patrón de 13 PAHs.

Columna: Hypersil Green PAH (100 x 4.6 mm). Temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/agua, (véase tabla 36). Caudal: 1 ml/min. Detección fluorimétrica, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 254/375 nm. V. inyección: 20 μ l.

selección del programa de las parejas de longitudes de onda de excitación/emisión. Este estudio se efectúa con el detector fluorimétrico Perkin Elmer LS 30.

Para ello, tomando como base las longitudes de onda óptimas de excitación y emisión, apartado 3.1.1., y los tiempos de retención de los PAHs, se efectúan varios programas seleccionando el indicado en la tabla 37. Con el fin de evitar fluctuaciones de la línea base debido por una

TABLA 37

Programa de longitudes de onda de excitación/emisión

Compuesto detectado	Tiempo, s	λ_{ex} , nm	λ_{em} , nm
1-Naftaleno, 2-acenafteno, 3- fluoreno	0	280	324
4-Fenantreno	720	250	365
5-Antraceno	840	254	402
6-Fluoranteno	940	285	465
7-Pireno	1005	270	390
8-B(a)a, 9-criseno	1230	270	384
10-B(e)p	1410	290	390
11-B(a)p	1590	295	405
12-Db(ah)a, 13-B(ghi)p	1755	290	418

Factor de atenuación = 256 para todos los cambios procedidos.

parte al gradiente de la fase móvil y por otra al cambio de las parejas de longitudes de onda, el naftaleno, acenafteno y fluoreno se detectan a las mismas longitudes

de onda 280/324 nm. Por otra parte el hecho de que se encuentren algunos picos cromatográficos muy próximos entre sí, imposibilita poder efectuar el cambio a las longitudes de onda óptimas de algunos PAHs, como ocurre con el benzo(a)antraceno y criseno que se detectan a las mismas longitudes de onda 270/384 nm, y el dibenzo(ah)antraceno y benzo(ghi)perileno con la pareja de 290/418 nm.

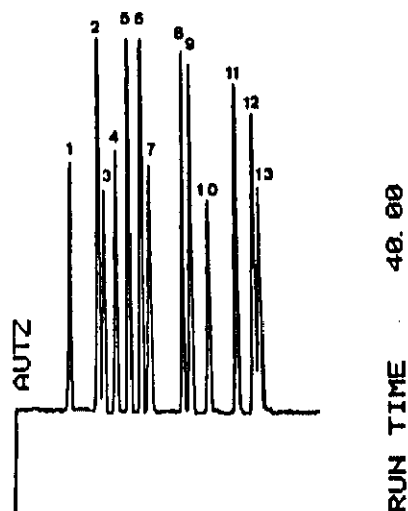
En la figura 51 se muestra el cromatograma obtenido en las condiciones optimizadas.

Las concentraciones de los PAHs en la mezcla patrón son bastante inferiores a las de los cromatogramas que aparecen en las figuras 48, 49 y 50, debido a que en este caso el sistema de detección utilizado es bastante más sensible.

El cambio de detector ha influido también, aunque ligeramente, en la resolución cromatográfica debido a: los cambios de las conexiones efectuadas desde la salida de la columna analítica hasta la entrada a la célula del detector, al tamaño de dicha célula y a las longitudes de onda utilizadas para la detección de los PAHs.

A continuación se resumen las condiciones óptimas para la separación y determinación de los 13 PAHs objeto de estudio:

- Caudal: 1 ml/min.
- Gradiente de la fase móvil: tabla 36.
- Programa de longitudes de onda de excitación y emisión: tabla 37.
- Temperatura de la columna analítica: 22°C.



PAH	c. ng/μl
1- Naftaleno	0.88
2- Acenafteño	0.44
3- Fluoreno	0.20
4- Fenantreno	0.13
5- Antraceno	0.11
6- Fluoranteno	0.05
7- Pireno	0.06
8- B(a)a	0.08
9- Criseno	0.18
10- B(e)p	0.13
11- B(a)p	0.04
12- DB(ah)a	0.10
13- B(ghi)p	0.08

FIGURA 51: Cromatograma de HPLC de una muestra patrón de 13 PAHs.

Columna: Hypersil Green PAH (100 x 4.6 mm). Temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/agua, (véase tabla 36). Caudal: 1 ml/min. Detección fluorimétrica: (véase tabla 37). V. inyección: 20 μl.

3.2.3.1.2. Características analíticas

Para la cuantificación de los PAHs se han tomado como base las áreas de los picos cromatográficos y para su

identificación los tiempos de retención. A continuación se representan los calibrados de cada uno de ellos; también se indica la sensibilidad, expresada por la pendiente de los calibrados y los límites de detección, y la precisión del método para su determinación.

Calibrados

Los calibrados, figuras 52, 53, 54 y 55, se han obtenido inyectando 5 mezclas patrones de los 13 PAHs en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.01 y 1.5 ng/ μ l. Para ello se ha seguido el procedimiento indicado en el apartado 2.4.2.4.2.a. de la parte experimental de esta Memoria.

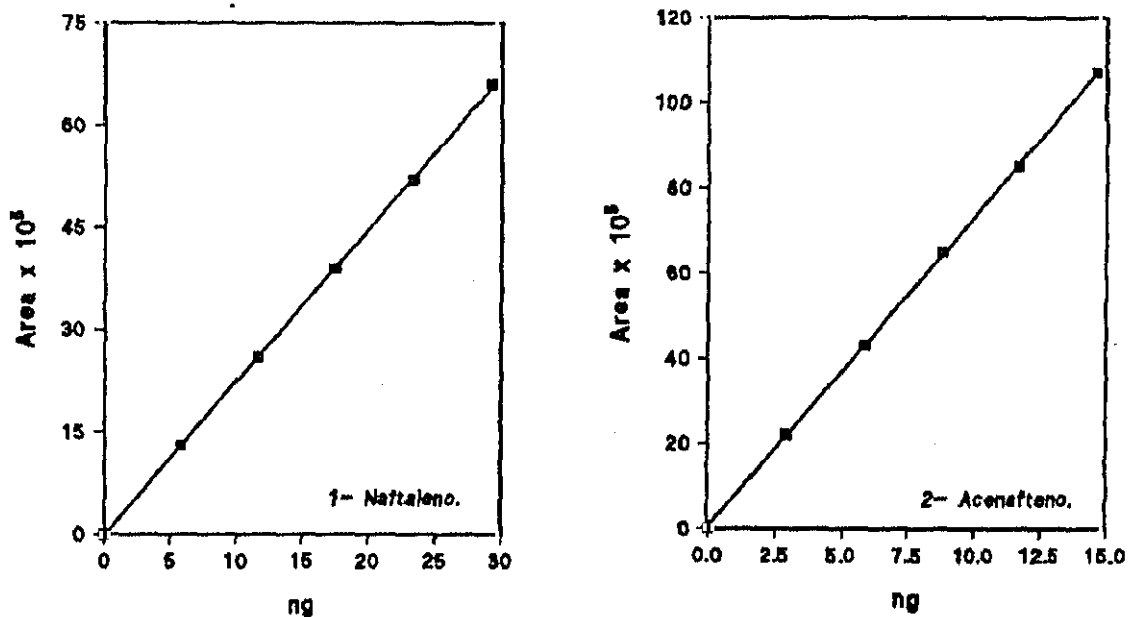


FIGURA 52: Calibrados del naftaleno y acenafteno. Condiciones: véase figura 51.

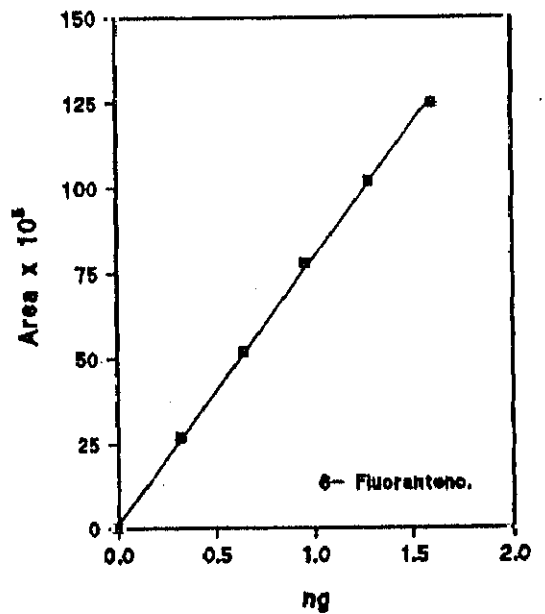
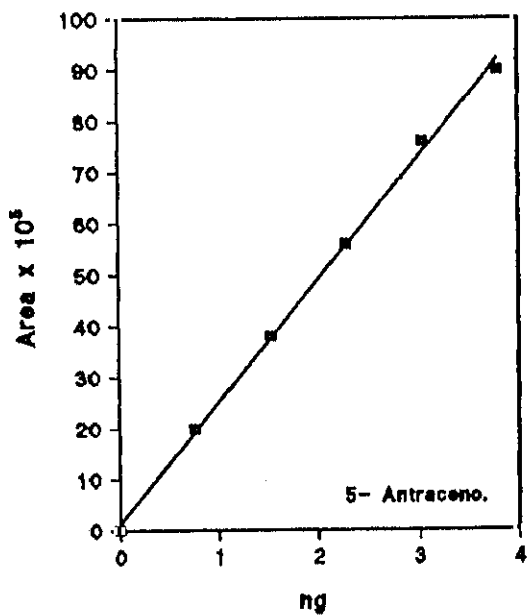
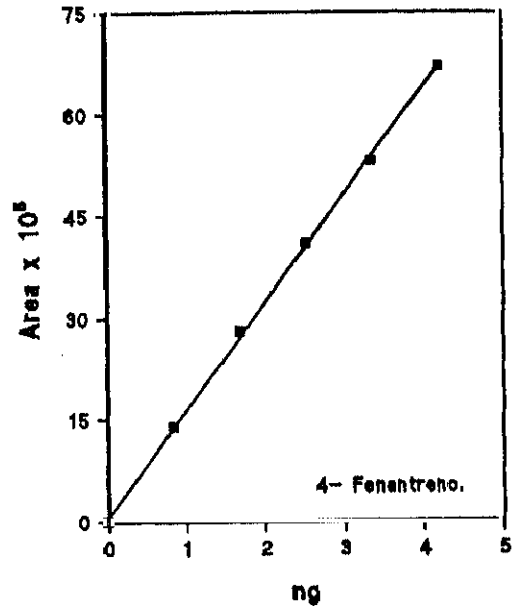
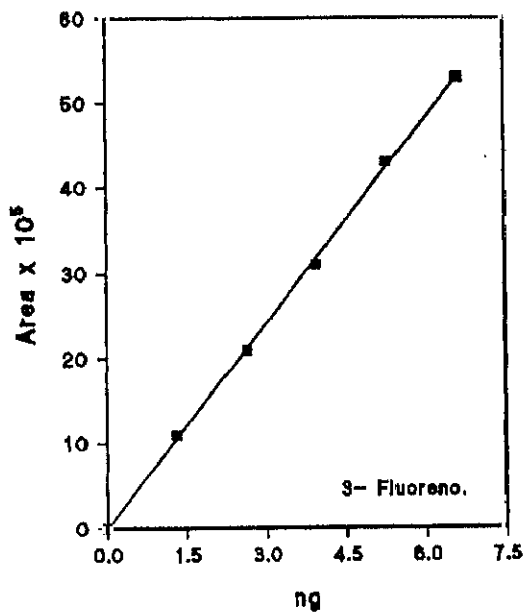


FIGURA 53: Calibrados del fluoreno, fenantreno, antraceno y fluoranteno.
 Condiciones: véase figura 51.

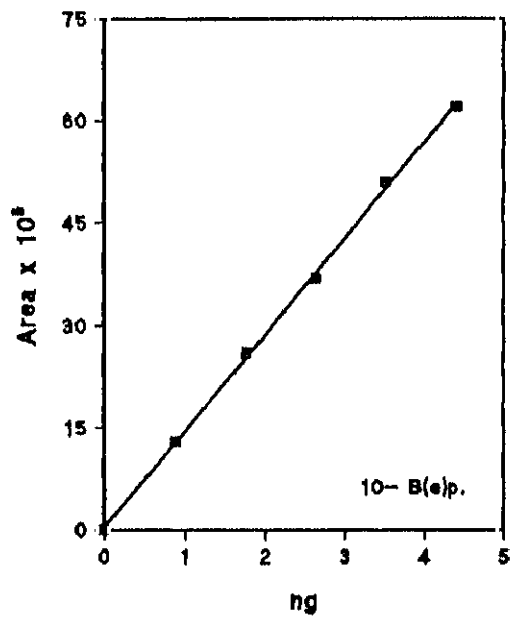
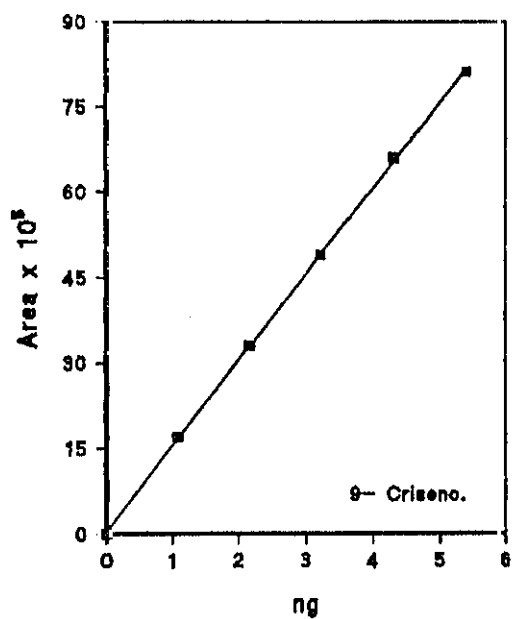
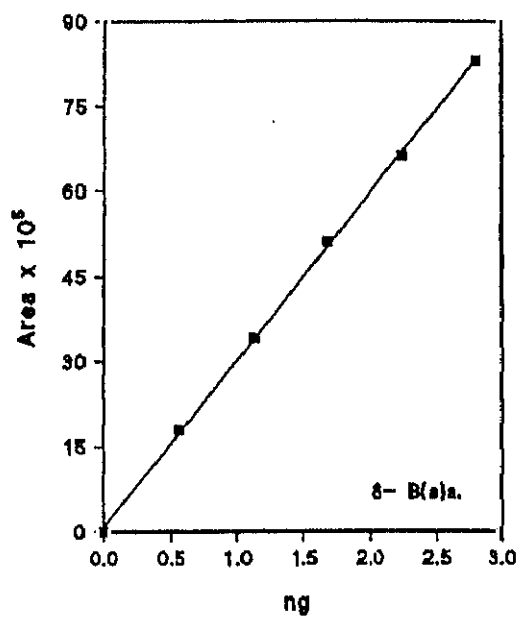
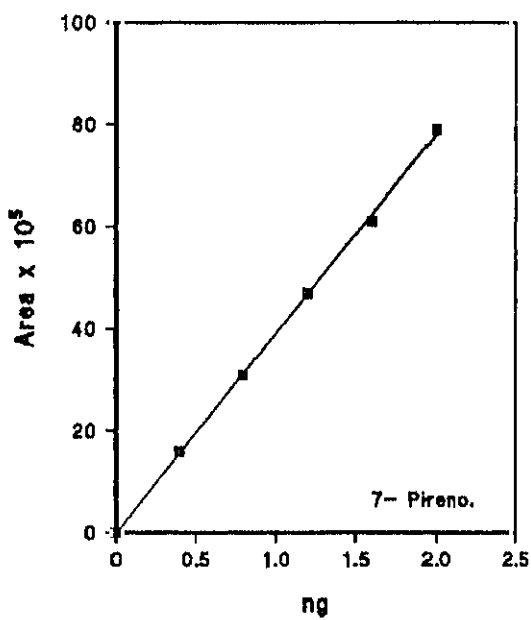


FIGURA 54: Calibrados del pireno, B(a)a, criseno y B(e)p.
Condiciones: véase figura 51.

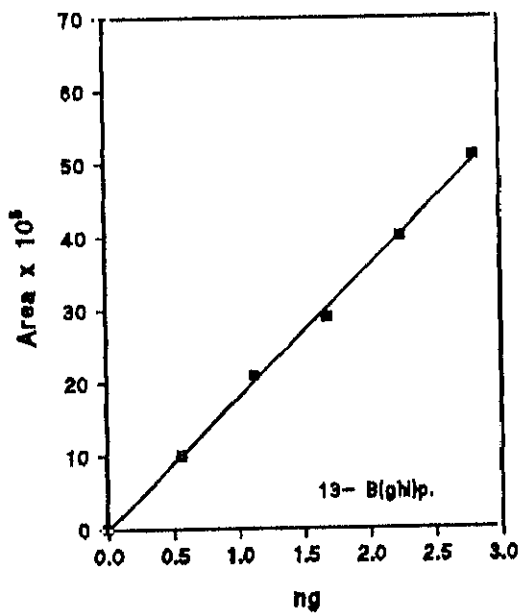
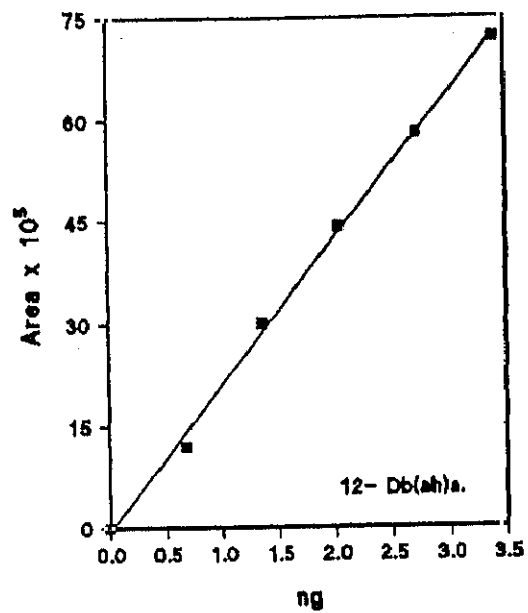
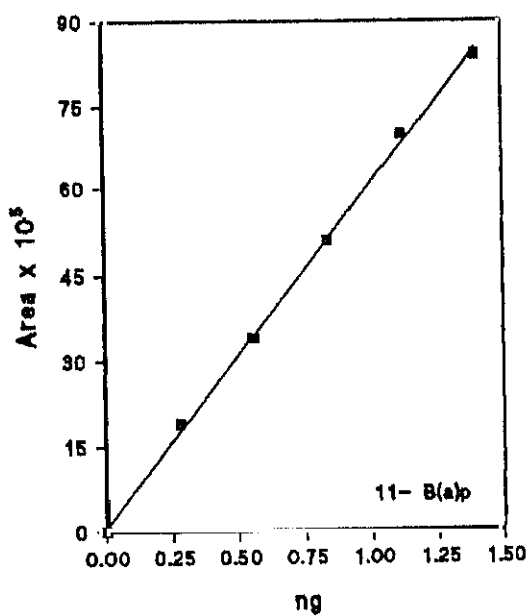


FIGURA 55: Calibrados del B(a)p, Db(ah)a y B(ghi)p
 Condiciones: véase figura 51.

En la tabla 38 se muestran las pendientes, m, de los calibrados así como los intervalos lineales de concentraciones ensayados para cada uno de los PAHs. Como puede observarse los máximos valores de las pendientes corresponden al fluoranteno y benzo(a)pireno, siendo éstos de 78.2×10^5 y $60.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ respectivamente.

TABLA 38

Pendientes de los calibrados e intervalos de linealidad ensayados

PAH	$m \times 10^5, \text{ M}^{-1}$	Intervalo de linealidad [†] ng/ μ l
Naftaleno	2.25	0.3-1.5
Acenafteno	7.29	0.2-0.6
Fluoreno	8.03	0.07-0.3
Fenantreno	15.8	0.04-0.2
Antraceno	23.9	0.04-0.2
Fluoranteno	78.2	0.02-0.1
Pireno	39.0	0.02-0.1
B(a)a	29.4	0.03-0.1
Criseno	15.0	0.05-0.2
B(e)p	14.1	0.04-0.1
B(a)p	60.2	0.01-0.04
Db(ah)a	21.5	0.07-0.1
B(ghi)p	18.0	0.03-0.1

m: pendiente del calibrado

[†] límites ensayados

Los intervalos de linealidad oscilan entre 0.01 y 1.5 ng/ μ l, valores correspondientes a los límites inferior y superior del benzo(a)pireno y naftaleno respectivamente, con coeficientes de correlación superiores a 0.999.

Límites de detección

Los límites de detección (LD) se indican en la tabla 39. Para su determinación se ha tenido en cuenta la relación 3 S/N, tomando como base la expresión matemática siguiente:

$$\text{Señal (mV)} = \frac{\text{Área (0.5 } \mu\text{V x s)}}{0.5 \times W_i \text{ (s)}} \times 10^{-3}$$

donde W_i : anchura del pico cromatográfica en la línea base ($W_i = 60$ s para el ruido).

Como puede observarse los límites de detección varían desde 0.012 pg/ μ l para el fluoranteno hasta 0.45 pg/ μ l para el naftaleno. Estos valores de los LD son de 30 a 1000 veces inferiores a los indicados en la bibliografía (279).

TABLA 39

Límites de detección de los PAHs

PAH	c, ng/20 µl	Señal, mV	Ruido, mV	LD, pg/µl
Naftaleno	17.5	144.4	0.0236	0.45
Acenafteno	8.76	237.0	0.0236	0.15
Fluoreno	3.76	114.8	0.0236	0.15
Fenantreno	2.52	179.8	0.0296	0.050
Antraceno	2.28	222.2	0.0296	0.045
Fluoranteno	0.96	291.2	0.0236	0.012
Pireno	1.20	189.9	0.0152	0.015
B(a)a	1.68	212.5	0.0190	0.025
Criseno	3.24	193.4	0.0190	0.050
B(e)P	2.64	133.3	0.0296	0.10
B(a)p	0.84	195.4	0.0296	0.020
Db(ah)a	2.04	164.8	0.0296	0.050
B(ghi)p	1.68	113.3	0.0296	0.050

LD = 3 S/N (S/N: ruido)

Los bajos valores en los límites de detección son debidos a la utilización de un programa de nueve parejas de longitudes de onda de excitación/emisión, que permiten que la medida de fluorescencia prácticamente se efectúe a las longitudes de onda óptimas de cada uno de los PAHs.

Precisión

En la tabla 40 se indica la precisión del método. Como queda reflejado, la determinación de PAHs puede llevarse

a cabo con desviaciones estándar relativas, (s_r , %) comprendidas entre 0.9 y 10 % ($n = 4$), a los niveles de concentraciones de 0.028 - 0.87 ng/ μ l.

TABLA 40

Precisión en la determinación de PAHs

PAH	c, ng/ μ l	\bar{X} , ng/ μ l	$s * 10^{-3}$, ng/ μ l	s_r , %
Naftaleno	0.88	0.87	10	1.2
Acenafteno	0.44	0.44	4.0	0.90
Fluoreno	0.20	0.20	3.6	1.8
Fenantreno	0.13	0.13	1.7	1.4
Antraceno	0.076	0.072	7.2	10
Fluoranteno	0.048	0.048	0.58	1.2
Pireno	0.04	0.043	2.3	5.4
B(a)a	0.056	0.059	0.58	1.0
Criseno	0.11	0.11	7.5	6.6
B(e)p	0.088	0.09	1.8	1.9
B(a)p	0.028	0.028	1.0	3.6
Db(ah)a	0.10	0.098	4.5	4.6
B(ghi)p	0.056	0.063	5.8	9.3

c: concentración en el punto medio del calibrado, $n = 4$

En la tabla 41 se indican los tiempos de retención de los PAHs y su precisión expresada por la desviación estándar relativa, s_r , %, cuyos valores son todos inferiores al 1.5%.

TABLA 41

Tiempos de retención de los PAHs y precisión

PAH	t_r , min	s	s_r , %
Naftaleno	7.01	0.10	1.45
Acenafteno	10.85	0.10	0.91
Fluoreno	11.65	0.09	0.75
Fenantreno	13.27	0.08	0.59
Antraceno	14.94	0.06	0.37
Fluoranteno	16.50	0.06	0.37
Pireno	17.62	0.05	0.29
B(a)a	21.90	0.04	0.18
Criseno	22.96	0.06	0.24
B(e)p	25.18	0.06	0.22
B(a)p	28.82	0.04	0.14
Db(ah)a	31.12	0.09	0.28
B(ghi)p	31.92	0.11	0.34

n = 4

Finalmente hay que resaltar que la utilización de una columna específica para la separación de PAHs y el programa de longitudes de onda de excitación/emisión para su detección, ha dado lugar a la puesta a punto de un método altamente sensible y selectivo que ha permitido la determinación de estos contaminantes en muestras ambientales, como se verá posteriormente.

3.2.3.2. Columna Ultraspher

3.2.3.2.1. Optimización de las variables cromatográficas

Con el fin de poner a punto un método para la determinación de benzo(a)pireno en muestras de humo de tabaco, dado el poder cancerígeno que posee este PAH, se ha procedido a la optimización de los parámetros cromatográficos. Para ello se han efectuado varios ensayos inyectando una muestra de los 13 PAHs en concentraciones 0.04 a 0.88 ng/ μ l, utilizando una columna Ultraspher, y empleando como fase móvil gradiente de acetonitrilo/agua.

Como sistema de detección se ha utilizado el detector fluorimétrico LS 30 Perkin Elmer, a las longitudes de onda de excitación/emisión de 295/405 nm correspondientes a las óptimas del benzo(a)pireno.

Tras estas experiencias se ha llegado a las siguientes condiciones óptimas:

- Caudal: 1 ml/min
- Gradiente de la fase móvil: tabla 42
- $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 295/405
- Temperatura: 22°C.

En estas condiciones se ha obtenido el cromatograma de la figura 56. Como puede observarse la resolución es perfecta para la cuantificación del benzo(a)pireno en presencia de los PAHs que suelen eluir próximos al benzo(a)pireno.

TABLA 42

Gradiente de la fase móvil

Tiempo, min	A, %	B, %
0.0	55	45
5.0	55	45
30.0	85	15
40.0	85	15
42.0	55	45

A: acetonitrilo
B: agua

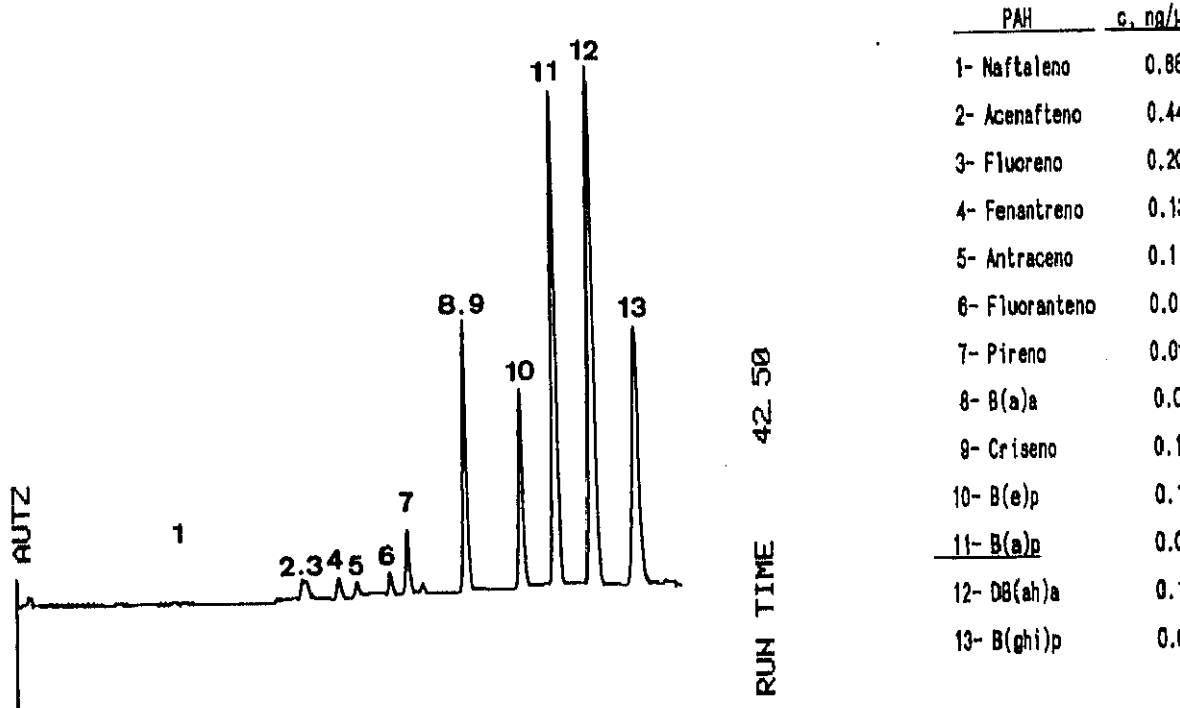


FIGURA 58 : Cromatograma de HPLC de una muestra patrón de 13 PAHs.

Columna: Ultraspher (125 x 4 mm). Temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/agua, (véase tabla 42). Caudal: 1 ml/min. Detección fluorimétrica, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 295/405 nm. V. inyección: 20 μ l.

3.2.3.2.2. Características analíticas

Teniendo en cuenta que este estudio se efectúa con la finalidad de poner a punto un método que permita la determinación de benzo(a)pireno en muestras ambientales y en concreto en el humo del tabaco, la cuantificación se lleva a cabo tomando como base el área del pico cromatográfico del benzo(a)pireno. Para ello se sigue el procedimiento especificado en el apartado 2.4.2.4.2.b.

En las tablas 43 y 44, se exponen las características analíticas del método para la determinación de este PAH.

Como puede observarse en la tabla 43 la desviación estandar relativa (s_r , %) es del 5.3% ($n=4$) al nivel de concentración de 0.02 ng/ μ l y respecto al tiempo de retención del 0.73%

TABLA 43

Precisión del método para la determinación del B(a)p

t_r : 33.67	c : 0.02
\bar{x} : 33.85	\bar{A} : 217×10^5
s : 0.25	s : 1.2×10^5
s_r , %: 0.73	s_r , %: 5.3

t_r : min

c : ng/ μ l

\bar{A} : Área media

$n = 4$

En la tabla 44 se indica el límite de detección del benzo(a)pireno. Se ha calculado según se ha indicado en el apartado 3.2.3.1.2.

TABLA 44

Límite de detección del benzo(a)pireno

PAH	c, ng/ μ l	Señal, mV	Ruido, mV	LD, pg/ μ l
B(a)p	0.04	147,4	0.0296	0.024

El valor del límite de detección 0.024 pg/ μ l, es 200 veces inferior al referido en la bibliografía (279).

El desarrollo de este estudio ha dado lugar a la puesta a punto de un método sensible y selectivo para la determinación de benzo(a)pireno en el humo de tabaco como se verá más adelante.

3.2.4. Aplicaciones de los métodos cromatográficos propuestos a la determinación de PAHs en aire, humo de tabaco y agua

3.2.4.1. Aire

Los métodos propuestos para la determinación de PAHs por CLM, apartado 3.2.2.2.2., y por HPLC utilizando la columna específica Green PAH, apartado 3.2.3.1., se han aplicado a la determinación de PAHs en muestras de aire urbano de la ciudad de Madrid.

Los resultados obtenidos por ambos métodos se detallan a continuación.

3.2.4.1.1. Determinación de PAHs por CLM con fase móvil acetonitrilo/SDS.

Para la determinación de PAHs por CLM en muestras de aire particulado de la ciudad de Madrid se han seguido los procedimientos especificados en los apartados 2.4.3.1. y 2.4.2.4.1.b. correspondientes a la preparación de las muestras y determinación cromatográfica de los PAHs respectivamente.

En la tabla 45 se presentan los resultados obtenidos aplicando el método propuesto a 3 muestras de aire urbano. También se indican los resultados obtenidos por cromatografía de gases (GC) aplicando el método TO-13 (279) recomendado por la EPA con el fin de comprobar la validez

del método.

TABLA 45

Determinación de PAHs por CLM en muestras de aire particulado de la ciudad de Madrid. (ng/m³ aire)^{*}

Nº	PAHs	Muestra ^{**}					
		M5		M6		M7	
		CLM	GC ^{***}	CLM	GC ^{***}	CLM	GC ^{***}
1	Naftaleno	-	-	-	-	-	-
2	Fluoreno	-	-	-	-	-	-
3	Acenafteno	-	-	-	-	-	-
4	Fenantreno	1	1.3	3.3	6	1.5	1.8
5	Antraceno	0.4	0.2	0.7	1.2	0.3	0.3
6	Fluoranteno	2.1	11.3	1.5	12.7	0.5	6.1
7	Pireno	5.2	11.9	3.5	16.5	-	7.9
8	Criseno		6.5		13.3		8.2
9	B(a)a	18	5	11.5	7.3	9.9	6.9
10	B(e)p	19	2	15.8	6.3	14.7	2.1
11	B(a)p	3.9	3.9	7.8	7.6	3.2	6
12	B(ghi)p	4.8	2.8	3.3	3.5	9.3	9.9
13	Db(ah)a	0.6	-	1.0	0.8	0.9	0.9

^{*} (n = 2)

^{**} Las muestras han sido tomadas en invierno de 1993

^{***} Gromatografía de gases (279)

El criseno y benzo(a)antraceno se determinan conjuntamente por CLM debido al solapamiento de los picos cromatográficos correspondientes a los dos PAHs.

Puede observarse que los PAHs de bajo peso molecular, naftaleno, fluoreno y acenafteno no se identifican en ninguna de las tres muestras analizadas por ambos métodos, debido a la volatilidad que poseen y por consiguiente pueden perderse a lo largo del proceso de la preparación de las muestras; por la misma razón, no suelen encontrarse con frecuencia en el aire particulado.

Cabe destacar que los resultados obtenidos para el fenantreno, antraceno, benzo(a)pireno, benzo(ghi)perileno y dibenzo(ah)antraceno son concordantes por ambos métodos. Por CLM se obtienen resultados inferiores para los PAHs fluoranteno y pireno debido posiblemente a una mayor resolución cromatográfica por parte de este método. En el caso concreto del benzo(e)pireno las diferencias por exceso entre los resultados obtenidos por los dos métodos pueden ser debidas al solapamiento de este PAH con benzo(k)fluoranteno y benzo(b)fluoranteno cuando la determinación se efectúa por CLM.

Por otra parte las diferencias entre resultados también pueden justificarse teniendo en cuenta que, la forma en que se lleva a cabo la integración de los picos cromatográficos en cada uno de los dos métodos es diferente.

3.2.4.1.2. Determinación de PAHs por HPLC utilizando la columna específica Green PAH y acetonitrilo/agua como fase móvil

Siguiendo los procedimientos descritos en los apartados 2.4.3.1. y 2.4.2.4.2.a. para la preparación de la muestra y su análisis por HPLC respectivamente, se han determinado los PAHs en seis muestras de aire urbano de la ciudad de Madrid.

En primer lugar, y con el fin de comprobar la validez del método propuesto en el apartado 3.2.3.1. se comparan los resultados de tres de las muestras (M5, M6 y M7), con los obtenidos por cromatografía de gases (GC) aplicando el método TO-13 (279).

En la figura 57 se presenta el cromatograma correspondiente a la muestra de aire M6. Los resultados de los análisis de las tres muestras se indican en la tabla 46.

Las discrepancias entre resultados pueden atribuirse a diferentes factores, así, los contenidos de fluoranteno, pireno y benzo(a)antraceno, son inferiores a los obtenidos por GC posiblemente debido a una mayor selectividad del método propuesto; las diferencias por defecto en los contenidos de criseno en las muestras M6 y M7 puede justificarse teniendo en cuenta que por GC se determinan conjuntamente criseno y trifenileno.

Las diferencias por exceso pueden ser debidas a la notable sensibilidad y selectividad que presenta el método propuesto debido a la utilización de una columna específica

de PAHs y de un programa de nueve parejas de longitudes de onda de excitación/emisión para la detección de los PAHs.

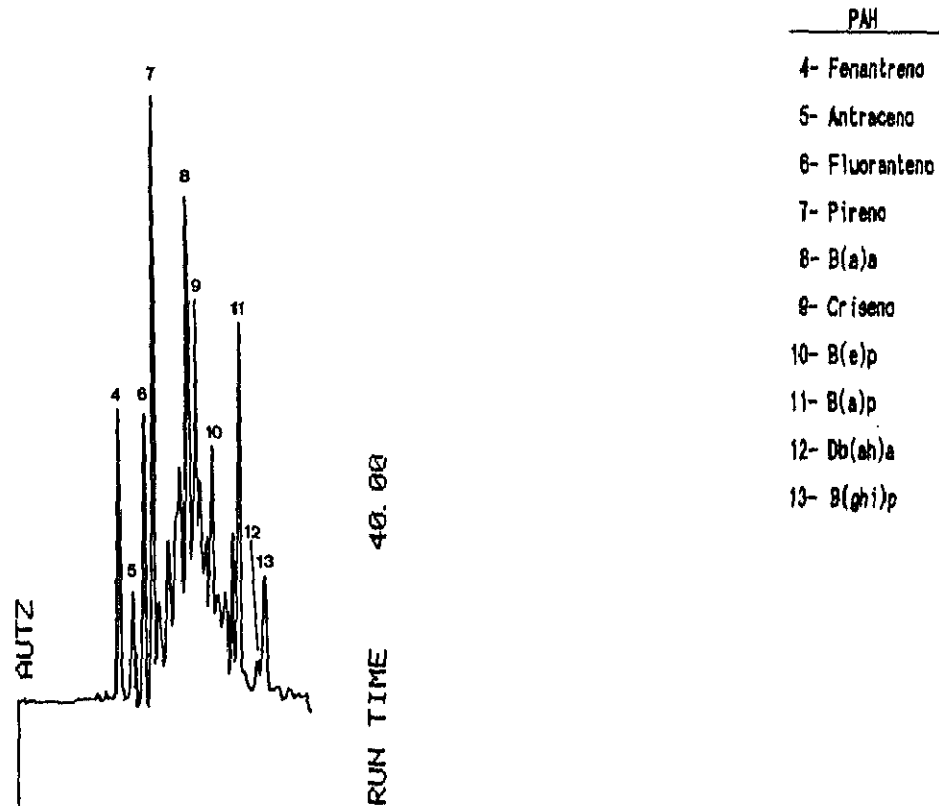


FIGURA 57: Cromatograma de HPLC de la muestra M8 de aire urbano.

Columna: Hypersil Green PAH (100 x 4.8 mm). Temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/agua, véase tabla 36 (apartado 3.2.3.1.1.). Caudal: 1 ml/min. Detección: Fluorimétrica, véase tabla 37 (apartado 3.2.3.1.1.). V. inyección: 20 µl.

TABLA 46

Determinación de PAHs por HPLC en muestras de aire particulado de la ciudad de Madrid. (ng/m³ aire)^{*}

Nº	PAHs	Muestra ^{**}					
		M5		M6		M7	
		HPLC	GC ^{***}	HPLC	GC ^{***}	HPLC	GC ^{***}
1	Naftaleno	-	-	-	-	-	-
2	Acenafteno	-	-	-	-	-	-
3	Fluoreno	-	-	-	-	-	-
4	Fenantreno	1.4	1.3	3.3	6.0	1.0	1.8
5	Antraceno	0.4	0.2	0.8	1.2	-	0.3
6	Fluoranteno	1.0	11.3	1.5	12.7	0.3	6.1
7	Pireno	8.6	11.9	6.1	16.5	2.4	7.9
8	B(a)a	-	5.0	5.4	7.3	3.5	6.9
9	Criseno	7.9	6.5	6.6	13.3	4.9	8.2
10	B(e)p	4.9	2.0	5.1	6.3	3.5	2.1
11	B(a)p	4.9	3.9	4.9	7.6	2.9	6.0
12	Db(ah)a	0.7	-	0.8	0.8	0.5	0.8
13	B(ghi)p	5.0	2.8	6.5	3.5	4.1	8.9

* (n = 2)

** Las muestras han sido tomadas en invierno de 1993

*** Cromatografía de gases (270)

Por otra parte, como se ha indicado anteriormente, los resultados pueden variar si se tiene en cuenta que los integradores utilizados en los dos métodos son diferentes y al presentar deriva la línea base la forma de integración es distinta.

De acuerdo con la bibliografía (179, 279 y 286) la determinación de PAHs en aire particulado puede llevarse a cabo sin necesidad de realizar la etapa del clean-up cuando las muestras se encuentran poco contaminadas. El captador que se ha utilizado para la toma de muestras analizadas en esta memoria ha sido de alto volumen por lo que debido a esta característica, las muestras deben estar bastante contaminadas.

Considerando que el método propuesto ofrece las características analíticas de alta sensibilidad (utilización de nueve parejas de longitudes de onda óptimas de excitación/emisión para su detección fluorimétrica) y selectividad (por la razón indicada y además por la utilización de una columna específica de PAHs), se ha estudiado la posibilidad de efectuar la determinación de PAHs sin necesidad de llevar a cabo la etapa del clean-up, operación que resulta laboriosa y de larga duración. Para ello, el extracto de una muestra de aire (M9) se dividió en dos fracciones; en una de ellas se practicó el clean-up y en la otra se eliminó esta etapa.

Los cromatogramas obtenidos se encuentran representados en las figuras 58 y 59. En el cromatograma de la figura 58, aparecen uno picos cromatográficos debidos a la presencia de compuestos fluorescentes muy polares y polares, ahora bien como puede observarse, son los primeros en eluir y no interfieren en la determinación de los PAHs

estudiados.

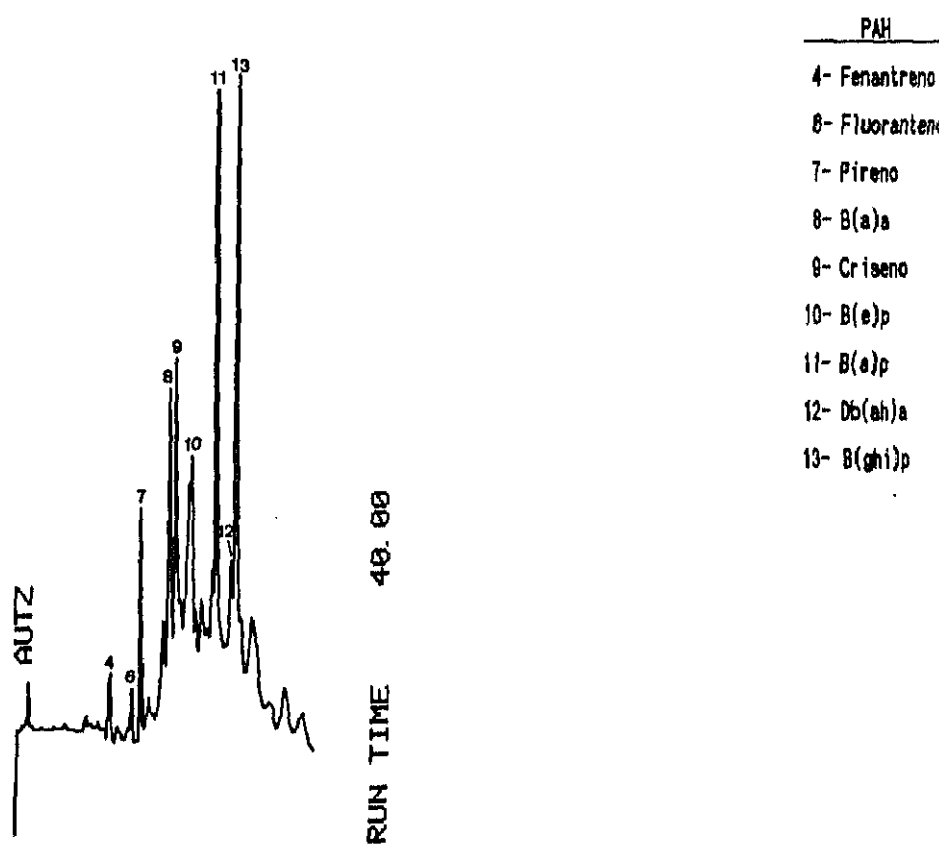


FIGURA 58: Cromatograma de HPLC de la muestra M9 a la que se ha practicado la etapa de purificación.

Columna: Hypersil Green PAH (100 x 4.6 mm). Temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/agua, véase tabla 36 (apartado 3.2.3.1.1.). Caudal: 1 ml/min. Detección: Fluorimétrica, véase tabla 37 (apartado 3.2.3.1.1.). V. inyección: 20 µl.

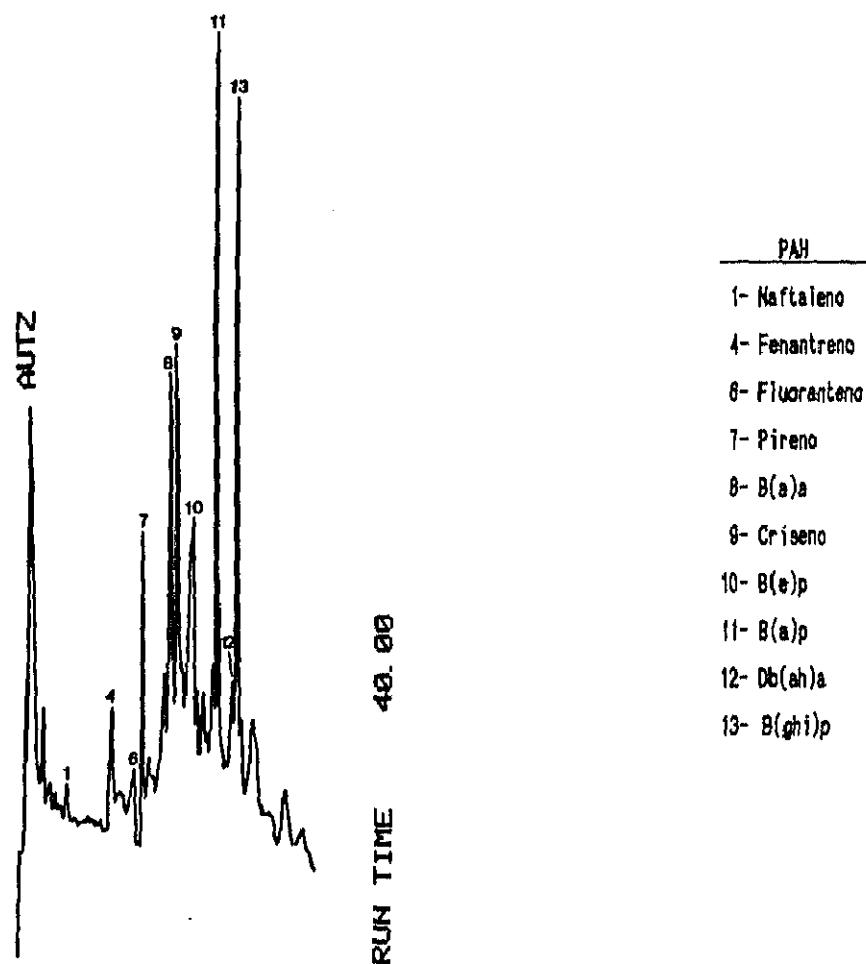


FIGURA 59: Cromatograma de HPLC de la muestra M9 en la que se ha eliminado la etapa de purificación.

Columna: Hypersil Green PAH (100 x 4.6 mm). Temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/agua, véase tabla 36 (apartado 3.2.3.1.1.). Caudal: 1 ml/min. Detección: Fluorimétrica, véase tabla 37 (apartado 3.2.3.1.1.). V. inyección: 20 µl.

Por otra parte, los compuestos alifáticos que existen en la muestra de aire no son detectados por no ser compuestos fluorescentes, sin embargo, por GC/FID sí podrían detectarse, por lo que habría que proceder a su separación previa mediante la etapa del clean-up.

En la tabla 47 se recogen los resultados de tres muestras de aire; en ella se indican los resultados obtenidos efectuando la etapa de purificación y los obtenidos cuando no se lleva a cabo esta etapa.

Tanto en las figuras 58 y 59 como en la tabla 47 puede observarse que se obtienen mayores contenidos de PAHs cuando el análisis se efectúa sin llevar a cabo la etapa del clean-up, obvio teniendo en cuenta la manipulación que requiere esta etapa. Así por ejemplo, los picos cromatográficos de la figura 59 son más intensos que los de la 58, observándose además la presencia de hidrocarburos muy volátiles como es el caso del naftaleno (pico cromatográfico 1)

No obstante los resultados obtenidos por ambos métodos son muy similares, lo que demuestra que la etapa del clean-up puede ser eliminada cuando se aplica el método propuesto a la determinación de PAHs en muestras de aire urbano, al menos cuando éstas se encuentran contaminadas a estos niveles de concentración de PAHs.

TABLA 47

Determinación de PAHs por HPLC en muestras de aire particulado de la ciudad de Madrid. (ng/m³ aire)^{*}

Nº	PAHs	Muestra ^{**}					
		M8		M9		M10	
		HPLC	HPLC ^{***}	HPLC	HPLC ^{***}	HPLC	HPLC ^{***}
1	Naftaleno	-	-	-	1.0	-	-
2	Acenafteno	-	-	-	-	-	-
3	Fluoreno	1.6	1.5	-	-	0.4	0.1
4	Fenantreno	0.2	0.5	0.2	0.5	1.5	1.8
5	Antraceno	-	-	-	-	-	-
6	Fluoranteno	0.2	0.3	0.1	0.1	0.1	0.2
7	Pireno	0.5	0.6	0.2	0.2	0.1	0.01
8	B(a)a	2.0	2.6	0.5	0.6	1.8	2.1
9	Criseno	3.2	4.2	1.0	1.2	2.7	3.5
10	B(e)p	1.2	1.0	0.1	0.2	1.0	0.7
11	B(a)p	1.4	1.7	0.4	0.5	0.8	0.8
12	Db(ah)a	0.6	0.6	0.1	0.1	0.5	0.5
13	B(ghi)p	4.0	4.4	1.8	1.8	3.2	3.5

^{*} (n = 2)

^{**} Las muestras han sido tomadas en invierno de 1993

^{***} sin realizar la etapa del clean-up

Por último hay que indicar que en las seis muestras analizadas, se encuentran pireno, benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno y benzo(ghi)perileno, hidrocarburos procedentes de las emisiones de vehículos, y el benzo(a)pireno, uno de los PAHs que presentan mayor toxicidad e indicador además de contaminaciones domésticos e industriales. Estos resultados son lógicos teniendo en cuenta que el muestreador se encuentra situado en el centro de Madrid con un elevado índice de tráfico rodado (287 y 288).

3.2.4.2. Humo de tabaco

3.2.4.2.1. Preparación de la muestra: Optimización de variables experimentales

Extracción

En primer lugar para la extracción de PAHs de los filtros, donde se encuentran adsorbidas las partículas del humo de tabaco, se han ensayado los tres agentes extractantes más utilizados, de acuerdo con la bibliografía para este tipo de muestras, acetonitrilo, cloruro de metileno y ciclohexano (289).

Cuando se utiliza acetonitrilo como agente extractante se obtienen muchas interferencias en el análisis cromatográfico debido a la presencia de otros compuestos en el extracto, que no son de interés en este estudio. Por otra parte la evaporación a vacío del disolvente, etapa previa para llevar a cabo la purificación del extracto, es muy lenta.

La utilización de cloruro de metileno ha dado mejores resultados que el acetonitrilo en cuanto a que es más rápida su evaporación a vacío, pero debido a su alto poder de extracción por la nicotina y otros compuestos polares, ha dado lugar a dificultades en el aislamiento de estos compuestos en la operación del clean-up.

El ciclohexano ha sido seleccionado como agente extractante del benzo(a)pireno en el humo de tabaco, debido

a que presenta menores interferencias para su determinación cromatográfica, siendo el volumen optimizado para la extracción de 10 ml.

Por otra parte, se ha estudiado la recuperación del benzo(a)pireno. Para ello se han utilizado cuatro filtros; a tres de ellos se les ha adicionado 100 ng de benzo(a)pireno y el cuarto se ha utilizado como blanco. A continuación se ha procedido a la extracción con 10 ml de ciclohexano, agitando para ello durante 30 minutos en baño de ultrasonidos; del extracto se han tomado 2 ml y se ha efectuado el cambio de disolvente a metanol; posteriormente se ha aplicado el procedimiento del apartado 2.4.2.4.2.b. para la determinación cromatográfica del benzo(a)pireno en cada una de las muestras. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 48, en la que puede observarse que se obtiene una recuperación del 102% en el proceso de extracción del benzo(a)pireno.

TABLA 48

Recuperación del benzo(a)pireno en el proceso de extracción

Filtro	B(a)p, ng		Recuperación	
	añadido	encontrado	R, %	\bar{R} , %
1	100	105	105	102
2	100	103	103	
3	100	99	99	
4	-	-	-	

Purificación

Por otra parte se ha procedido a la purificación de los extractos procedentes de los filtros 1, 2 y 3.

En esta etapa se han utilizado cartuchos sep-pak de sílice, con el fin de eliminar al máximo la presencia de compuestos polares en la fracción eluída, como por ejemplo la nicotina, componente mayoritario en este tipo de muestras y por consiguiente muy interferente.

Los disolventes acondicionadores de los cartuchos y los eluyentes empleados en este estudio han sido seleccionados tras un planteamiento teórico sobre las propiedades de estos disolventes, teniendo en cuenta la polaridad de cada uno de ellos (290) y la base general de la extracción en fase sólida (SPE). Por consiguiente los disolventes que se han utilizado han sido el ciclohexano como acondicionador (15 ml) y como eluyente el cloruro de metileno (2 ml). Para ello se ha seguido el procedimiento 2.4.3.2. descrito en la parte experimental.

En la tabla 49 se indica la recuperación del benzo(a)pireno en el proceso de purificación, siendo ésta del 38%. Esta baja recuperación lógicamente es debida a la elevada complejidad de este tipo de muestras.

TABLA 49

Recuperación del B(a)p en el proceso de purificación

Filtro	B(a)p, ng		Recuperación	
	añadido	encontrado	R, %	\bar{R} , %
1	100	38.5	38.5	38
2	100	37.5	37.5	
3	100	38.0	38.0	

Al tratarse de muestras muy complejas con altos contenidos de diferentes compuestos, no ha sido posible obtener recuperaciones superiores en la etapa del clean-up, hecho que se hubiera conseguido utilizando mayor volumen de eluyente, pero que conllevaría a un mayor número de interferencias; de esta manera se evitan éstas en el análisis cromatográfico a la par que se consigue mayor reproducibilidad en la cuantificación del benzo(a)pireno.

3.2.4.2.2. Determinación de benzo(a)pireno por HPLC utilizando fase móvil acetonitrilo/agua

La determinación del benzo(a)pireno se ha llevado a cabo en los dos tipos de tabaco, rubio y negro. Los filtros analizados contenían el humo particulado correspondiente a 5 cigarrillos (apartado 2.4.3.2.1.). Para ello se han seguido los procedimientos 2.4.3.2. y 2.4.2.4.2.b. donde se indican la preparación de las muestras y cuantificación del benzo(a)pireno.

Identificación

En primer lugar para la identificación del benzo(a)pireno en las muestras se ha tomado como base el tiempo de retención de este PAH. Para comprobar la veracidad del análisis, en una de las muestras preparadas del humo de tabaco, se han registrado los espectros de excitación y emisión en la fracción de elución correspondiente al pico cromatográfico, identificado como el del benzo(a)pireno, y se han comparado estos espectros, con los obtenidos en la fracción de elución de una muestra patrón que contenía únicamente benzo(a)pireno. El registro de los espectros se ha efectuado parando el flujo en el instante en que la fracción de elución correspondiente al benzo(a)pireno se encontraba en la célula del detector.

En las figuras 60 y 61 se presentan los espectros obtenidos en las muestras de tabaco y patrón respectivamente. Puede observarse que los espectros de emisión correspondientes a las dos fracciones de elución presentan el mismo hábito.

En lo que respecta a los espectros de excitación, es lógico que existan diferencias debido a que en la muestra de humo de tabaco existen compuestos que también presentan bandas de absorción en esta zona del espectro.

Por otra parte la banda de emisión aparece en la misma zona espectral tanto cuando la excitación se efectúa a 295 nm como cuando se realiza a 363 nm lo que confirma la evidencia del espectro (figura 60).

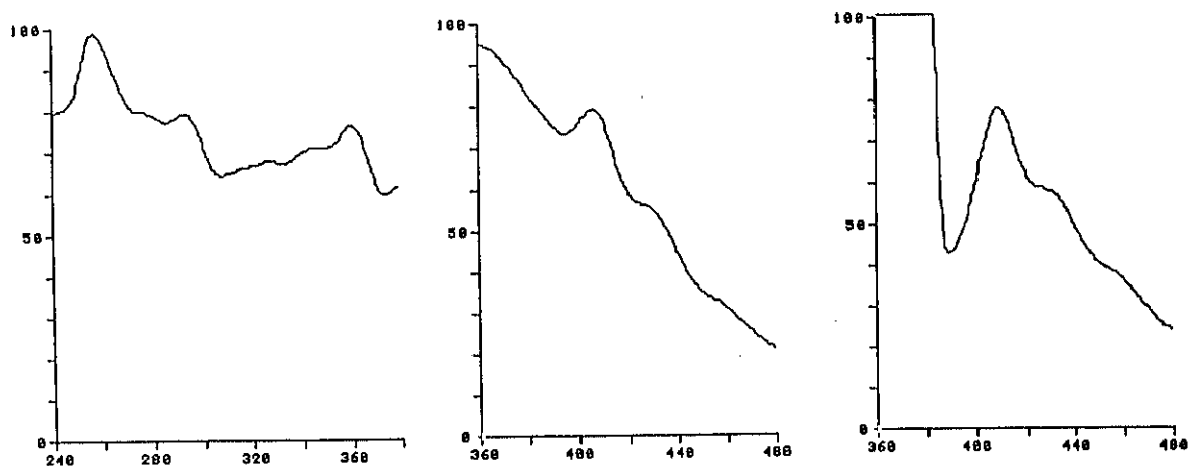


FIGURA 60: Espectros de excitación y emisión del benzo(a)pireno en una muestra de tabaco; (a), espectro de excitación ($\lambda_{ex} = 405$ nm); (b y c), espectros de emisión ($\lambda_{em} = 295$ y 363 nm)

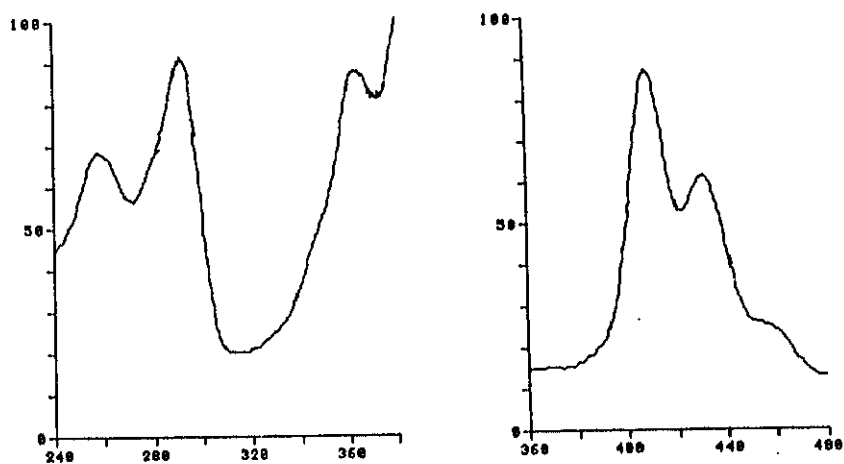


FIGURA 61: Espectros de excitación y emisión del benzo(a)pireno en una muestra patrón, 0.02 ng; (a): espectro de excitación ($\lambda_{ex} = 405$ nm); (b): espectro de emisión ($\lambda_{em} = 295$ nm)

Cuantificación

Para la cuantificación del benzo(a)pireno se ha tenido en cuenta el área del pico cromatográfico. Para ello se ha tomado como referencia el área correspondiente al de una muestra patrón de concentración del mismo orden que las de las muestras a determinar.

En la figura 62 se presenta dos cromatogramas. El (a) se ha obtenido inyectando 20 μ l de metanol, para comprobar que la zona donde se identifica el benzo(a)pireno está libre de interferencias. El cromatograma (b) se ha obtenido inyectando una muestra patrón del benzo(a)pireno como referencia para la identificación y cuantificación del mismo en las muestras de humo de tabaco. Estas inyecciones se realizaban previamente a la determinación del benzo(a)pireno en las muestras de humo de tabaco.

En las figuras 63 y 64 se presentan los cromatogramas obtenidos tras la inyección de dos muestras, una de tabaco rubio, figura 63, y otra de tabaco negro, figura 64.

Observando ambos cromatogramas se puede destacar que en general la complejidad de los dos tipos de muestras es del mismo orden, si bien el contenido es superior en el tabaco negro.

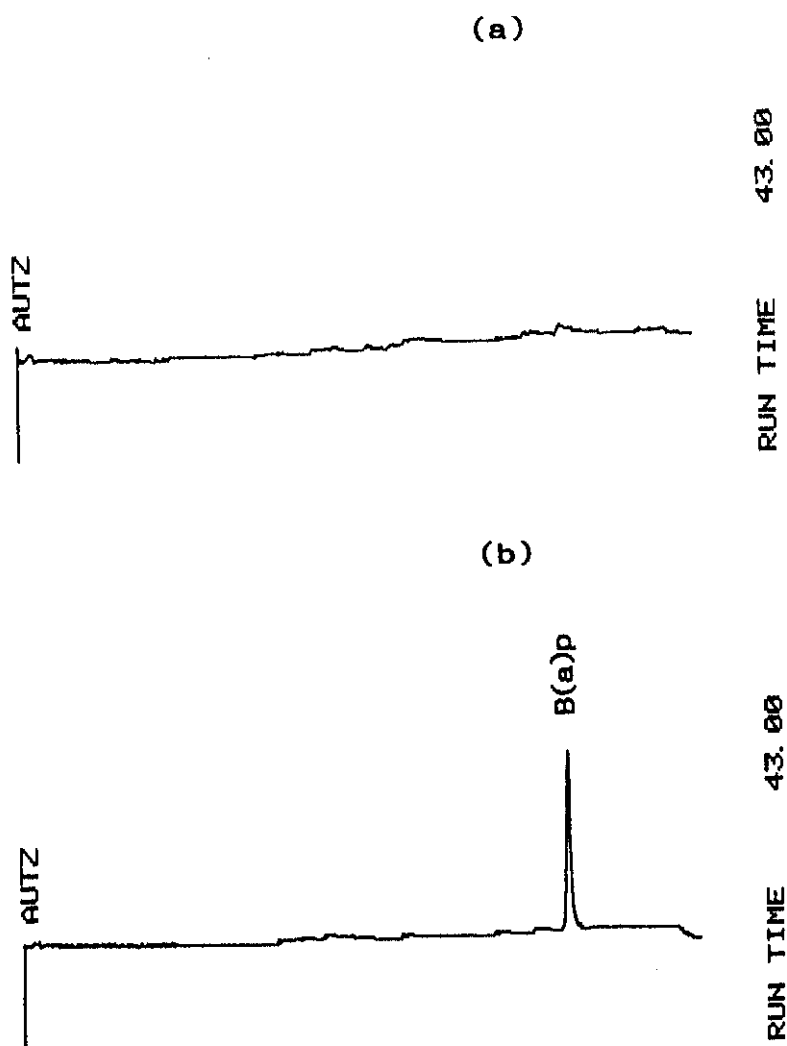


FIGURA 62: Cromatogramas de HPLC. (a): metanol; (b):benzo(a)pireno, 0.02 ng

Columna: Ultraspher 5 μm (125 x 4 mm). Temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/agua, véase tabla 42 (apartado 3.2.3.2.1.). Caudal: 1 ml/min. Detección fluorimétrico, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$: 295/405 nm. V. inyección: 20 μl .

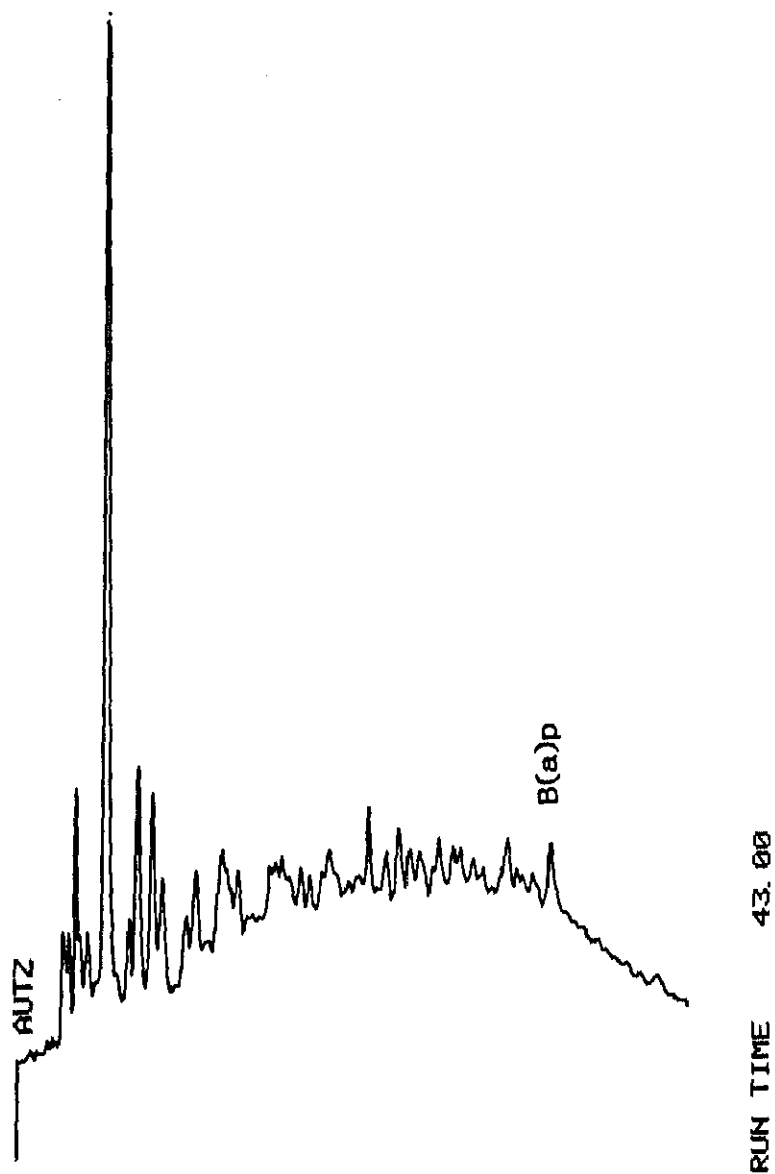


FIGURA 63: Cromatograma de HPLC de una muestra de tabaco rubio.

Columna: Ultraspher 5 μm (125 x 4 mm). Temp.: 22 $^{\circ}\text{C}$. Fase móvil: gradiente de ACN/agua, véase tabla 42 (apartado 3.2.3.2.1.). Caudal: 1 ml/min. Detección fluorimétrica, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$: 295/405 nm. V. inyección: 20 μl .

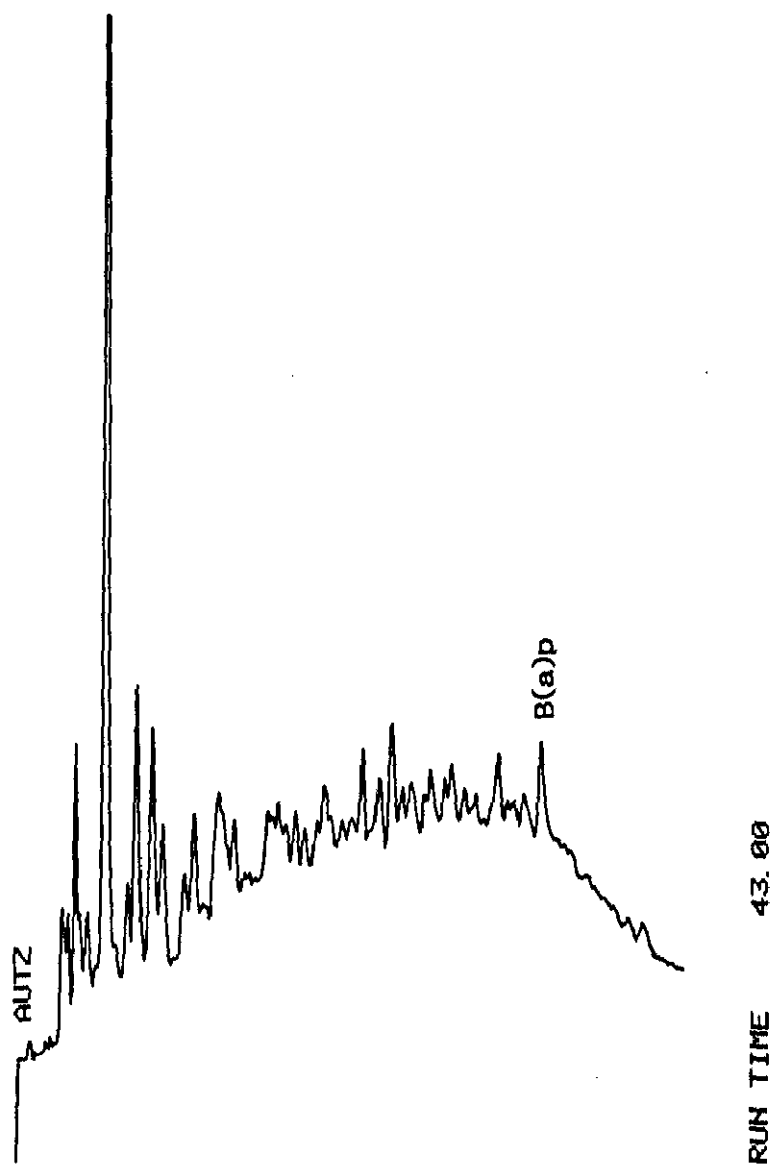


FIGURA 64: Cromatograma de HPLC de una muestra de tabaco negro.

Columna: Ultraspher 5 μm (125 x 4 mm). Temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/agua, véase tabla 42 (apartado 3.2.3.2.1.). Caudal: 1 ml/min. Detección fluorimétrico, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$: 295/405 nm. V. inyección: 20 μl .

En las tablas 50 y 51 se presentan los resultados de los análisis de 6 muestras de tabaco rubio y cuatro de tabaco negro. Puede observarse que el humo de tabaco negro tiene mayor contenido de benzo(a)pireno que el del tabaco rubio. En dichas tablas también aparecen las desviaciones estandar relativas, siendo éstas de 5.3 y 6.3% para los niveles de concentración de 69.1 y 106 ng de benzo(a)pireno/5 cigarrillos.

TABLA 50

Contenido de B(a)p en tabaco rubio. (ng/5 cigarrillos)

Muestra	c	\bar{x}	$s_r, \%$
1	74.4	69.1	5.3
2	69.1		
3	69.1		
4	69.8		
5	63.0		
6	68.9		

TABLA 51

Contenido de B(a)p en tabaco negro. (ng/5 cigarrillos)

Muestra	c	\bar{x}	$s_r, \%$
1	101.3	106.34	6.3
2	102.0		
3	106.0		
4	115.8		

3.2.4.3. Agua

3.2.4.3.1. Preparación de la muestra: Optimización de las variables experimentales

Con el fin de determinar PAHs en agua potable, agua de grifo y agua bruta de embalse, se ha procedido a la optimización de las variables experimentales para la preparación de la muestra. En primer lugar para la preconcentración de los PAHs en muestras de agua potable se han utilizado cartuchos de aparición reciente en el mercado, sep-pak vac μ C18. Este tipo de cartuchos se diferencian de los cartuchos C18 que existen normalmente en el mercado, en el tipo de fase enlazada al material de relleno del cartucho, siendo ésta monofuncional en los cartuchos C18 y trifuncional en los cartuchos μ C18.

3.2.4.3.1.1. Elección del eluyente

En primer lugar se ha procedido al acondicionamiento del cartucho tal y como recomienda la casa comercial, es decir pasando a través de su lecho 6 ml de metanol dos veces seguidas y a continuación 6 ml de agua Milli-Q otras dos veces. Inmediatamente antes de que todo el volumen de agua atravesase el lecho del cartucho se introduce la muestra patrón, utilizando para ello una micropipeta, de manera que ésta quede depositada en el centro de la superficie del cartucho. Por último se seca el cartucho, primeramente a vacío y posteriormente por centrifugación.

Por otra parte en todas las experiencias realizadas

a lo largo de este estudio se ha tomado un volumen de 100 μ l de una mezcla patrón de PAHs de concentración comprendidas entre 0.035 y 0.73 ng/ μ l; seguidamente se aplican los procedimientos 2.4.3.3. para la preparación de la muestra (respetando las variables que se estudian en cada caso) y 2.4.2.4.2.a., para la determinación de los PAHs.

Para la elección del eluyente se han estudiado los disolventes que figuran en la tabla 52, en la que se indican además las polaridades de cada uno de ellos (290). El volumen de eluyente utilizado en principio, para la realización de este estudio ha sido de 1 ml. En dicha tabla también aparece el número de PAHs detectados tras el empleo de cada uno de los eluyentes.

TABLA 52

Eluyentes estudiados

Nº	Eluyente	Polaridad	PAHs eluidos
1	Acetonitrilo	5.8	13
2	Metanol	5.1	13
3	Cloruro de metileno	3.1	10
4	Diétil éter	2.8	10
5	Hexano	0.1	13
6	n-pentano	0.0	13
7	n-pentano:diétil éter (0.6:10)	2.6	11
8	Diétil éter:cloruro de metileno (1:1)	3.0	12
9	Metanol:diétil éter (1:1)	4.0	10
10	Metanol:diétil éter (1:2)	3.6	10

En la tabla 53, o figura 65, se presentan las recuperaciones de los PAHs con cada uno de los disolventes, representados éstos con los números del 1 al 10, como queda indicado en la tabla 52.

TABLA 53

Efecto del tipo de eluyente en la recuperación de los PAHs

Nº	PAHs	R*, %									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Naftaleno	19	42	-	-	14	5.4	-	-	-	-
2	Acenafteno	33	24	-	-	10	6.3	-	9.0	-	-
3	Fluoreno	28	18	-	-	16	8.7	1.3	18	-	-
4	Fenantreno	43	24	19	9.5	33	18	54	47	11	13
5	Antraceno	43	19	18	8.3	21	90	49	84	11	12
6	Fluoranteno	46	20	51	40	44	22	50	66	46	44
7	Pireno	44	25	67	44	42	30	38	80	98	28
8	B(a)a	35	18	67	66	31	25	42	57	61	54
9	Criseno	30	15	65	81	30	23	38	56	58	60
10	B(e)p	19	12	67	74	29	27	36	94	89	63
11	B(a)p	19	13	88	74	28	31	41	53	72	55
12	Ob(ah)a	33	27	91	73.71	34	51	47	55	57	59
3	B(ghi)p	17	13	80	71	25	32	35	55	80	63

* Valores medios correspondientes a dos determinaciones.

Se han elegido los eluyentes 3 y 4, es decir cloruro de metileno y dietil éter por ser con éstos con los que se obtienen mayores recuperaciones para la mayoría de los PAHs, correspondiendo éstas además a los PAHs de mayor toxicidad tal y como puede observarse.

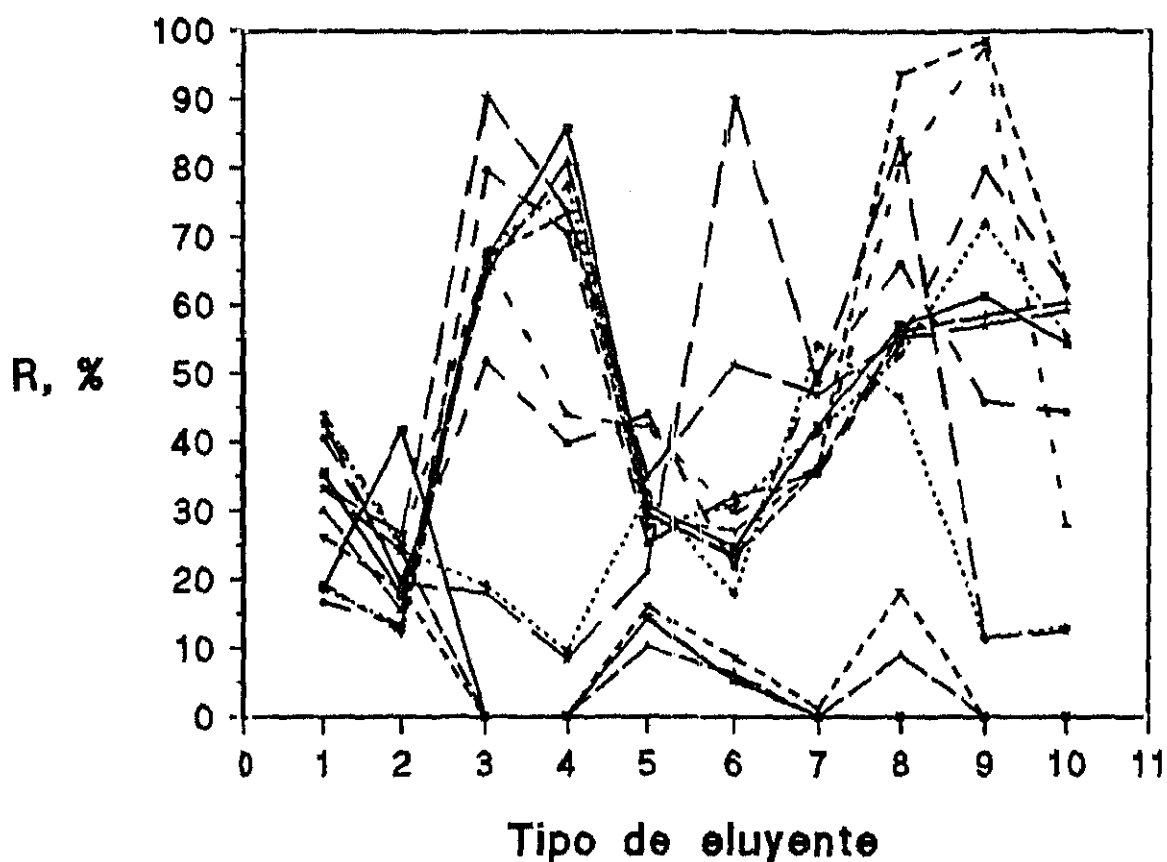


FIGURA 65: Efecto del tipo de eluyente en la recuperación de los PAHs

3.2.4.3.1.2. Efecto del volumen de eluyente

Seleccionados los dos disolventes y con el fin de mejorar las recuperaciones de los PAHs, se han ensayado

varios volúmenes de los dos eluyentes elegidos en el intervalo comprendido entre 1 y 4 ml. Los resultados se indican en las tablas 54 y 55 o figuras 66 y 67, en las que se han representado las recuperaciones de los PAHs frente al volumen de eluyente utilizado

TABLA 54

Efecto del volumen de cloruro de metileno en las recuperaciones de los PAHs

Nº	PAHs	R ¹ , %			
		1 ml	2 ml	3 ml	4 ml
1	Naftaleno	-	-	-	-
2	Acenafteno	-	-	-	-
3	Fluoreno	-	33	18	30
4	Fenantreno	19	72	55	99
5	Antraceno	18	74	54	75
6	Fluoranteno	521	81	86	81
7	Pireno	67	66	96	69
8	B(a)A	67	74	89	15
9	Criseno	65	82	95	98
10	B(e)p	67	69	92	72
11	B(a)p	68	58	93	95
12	Db(ah)a	91	45	94	75
13	B(ghi)p	80	39	79	87

¹ Valores medios correspondientes a dos determinaciones.

TABLA 55

Efecto del volumen de dietil éter en las recuperaciones de los PAHs

Nº	PAHs	R ² , %			
		1 ml	2 ml	3 ml	4 ml
1	Naftaleno	-	72	-	-
2	Acenafteno	-	72	70	35
3	Fluoreno	-	75	74	69
4	Fenantreno	9.5	86	96	96
5	Antraceno	8.3	84	71	93
6	Fluoranteno	40	78	90	89
7	Pireno	44	97	89	100
8	B(a)A	86	81	91	90
9	Criseno	81	83	86	92
10	B(e)p	74	64	87	34
11	B(a)p	78	75	90	83
12	Db(ah)a	74	79	83	68
13	B(ghi)p	71	84	85	78

* Valores medios correspondientes a dos determinaciones

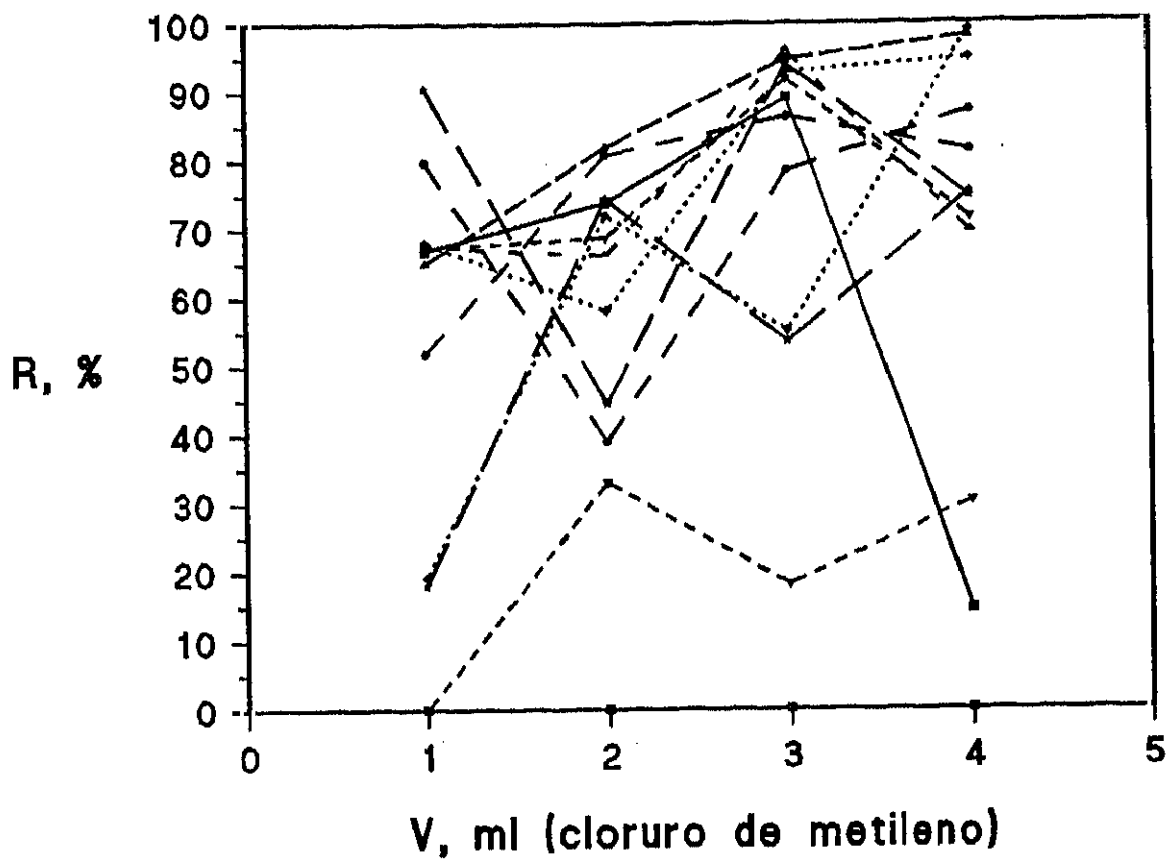


FIGURA 86: Efecto del volumen de cloruro de metileno en las recuperaciones de los PAHs.

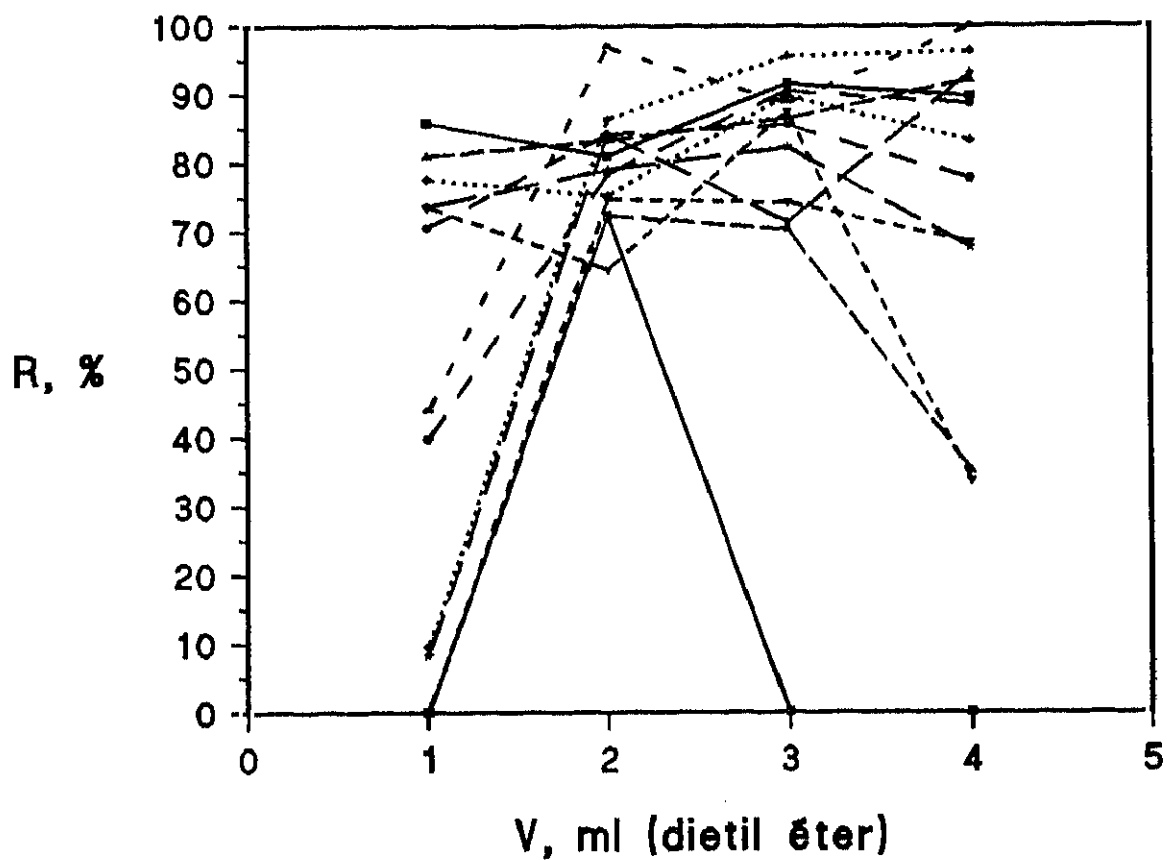


FIGURA 67: Efecto del volumen de dietil éter en las recuperaciones de los PAHs.

Observando los resultados obtenidos, parece ser que con dietil éter se obtienen mayores recuperaciones para la mayoría de los PAHs estudiados que con cloruro de metileno. Por otra parte comparando los volúmenes de 2 y 3 ml del dietil éter se puede observar que con 3 ml se obtienen mayores recuperaciones para la mayoría de los PAHs, con lo cual se ha elegido el volumen 3 ml de dietil éter como volumen óptimo de eluyente en este estudio.

Por último, con el fin de mejorar la reproducibilidad, esta operación se efectúa en dos etapas, primeramente la elución se lleva a cabo con los 3 ml de dietil éter y posteriormente con 1 ml.

3.2.4.3.1.3. Efecto del volumen de muestra de agua

Una vez seleccionado el eluyente, el siguiente paso ha consistido en optimizar el volumen de muestra de agua para la determinación de PAHs. Para ello se ha realizado el estudio disolviendo siempre el mismo volumen de la muestra patrón de PAHs, en volúmenes crecientes de agua Milli-Q agitando 10 minutos con ayuda del ultrasonidos y posteriormente se han aplicado los procedimientos explicados en los apartados 2.4.3.3., para la preparación de la muestra, y 2.4.2.4.2.a. para la determinación cromatográfica de los PAHs.

Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 56, en ella se indican los volúmenes de agua utilizados en este estudio, siendo éstos de 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 y 2000 ml, y las recuperaciones obtenidas.

En la figura 68 igualmente puede observarse este efecto, donde se representan las recuperaciones frente al volumen de muestra de agua utilizado.

Las máximas recuperaciones para la mayoría de los PAHs se obtienen para el volumen de agua de 1500 ml, por lo que

TABLA 56

Influencia del volumen de agua en las recuperaciones de los PAHs

Nº	PAHs	R*, %						
		50 ml	100 ml	250 ml	500 ml	1000 ml	1500 ml	2000 ml
1	Naftaleno	-	-	-	18	25	15	-
2	Acenafteno	17	32	42	59	57	65	73
3	Fluoreno	36	51	55	70	88	72	91
4	Fenantreno	64	74	82	80	76	98	75
5	Antraceno	51	53	68	70	64	71	73
6	Fluoranteno	67	78	81	77	78	85	94
7	Pireno	42	60	72	86	84	89	48
8	B(a)a	57	65	78	74	88	95	79
9	Criseno	58	66	75	71	70	76	73
10	B(e)p	48	57	63	65	84	85	60
11	B(a)p	46	41	52	58	51	67	56
12	Db(ah)a	39	45	50	53	45	66	66
13	B(ghi)p	38	39	39	48	46	80	38

* Valores medios correspondientes a dos determinaciones.

se ha considerado éste el óptimo para la determinación de estos contaminantes en muestras de agua.

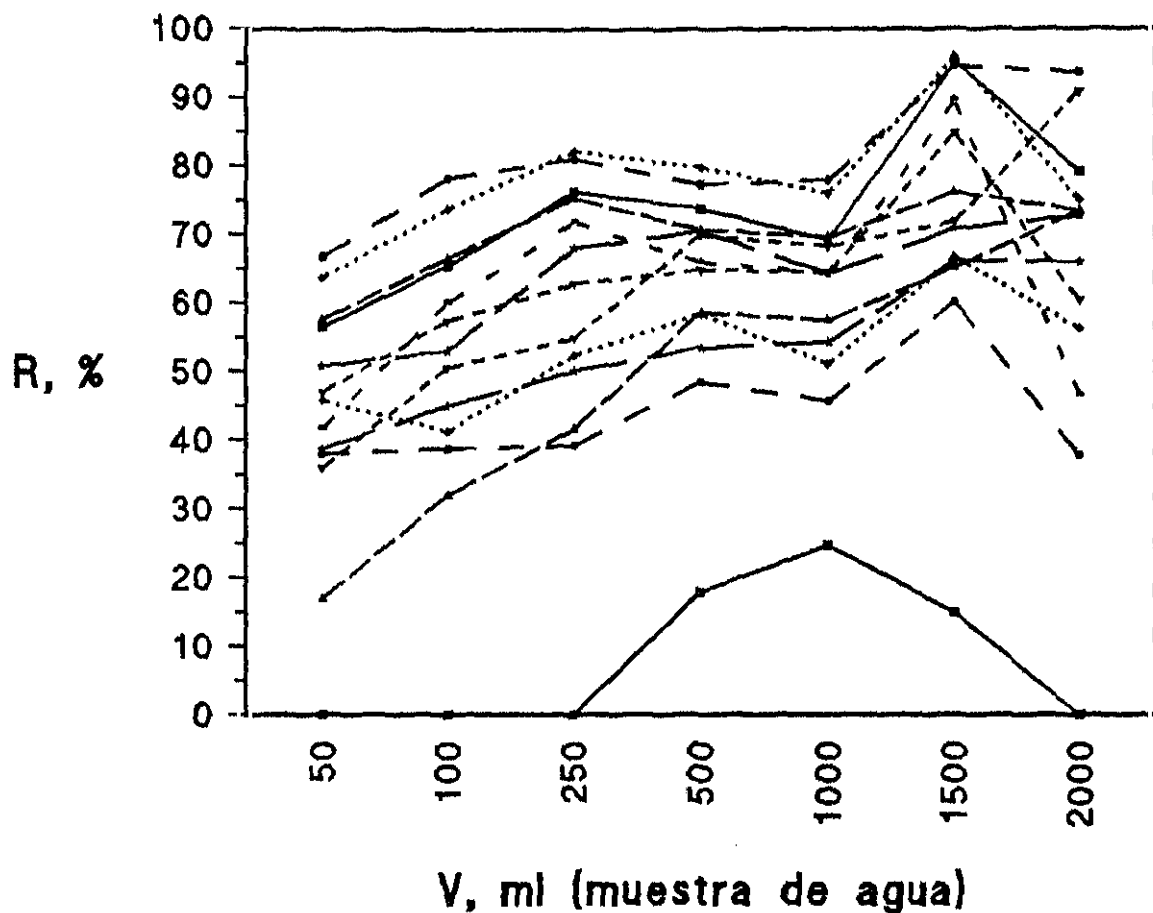


FIGURA 68: Influencia del volumen de agua en la recuperación de los PAHs

Por otra parte hay que indicar que el cambio de disolvente de dietil éter a metanol, una vez efectuada la elución de los PAHs, resulta lenta debido a la evaporación del dietil éter. Puede decirse que esta operación se realiza en dos etapas, la primera rápida, de 8 minutos, en la que se evapora la mayoría del volumen de disolvente, y la segunda más lenta, de 20 minutos, correspondiente a la evaporación de un volumen muy pequeño de agua eluída con el eluyente, equivalente a una gota (aproximadamente 0.05 ml). Este pequeño volumen es posible que haya quedado adsorbido por el relleno del cartucho debido al elevado volumen de muestra de agua que se pasa a través de su lecho.

La EPA recomienda utilizar, Na_2SO_4 anhidro para evitar la presencia de agua en el extracto, sin embargo la utilización de este adsorbente puede dar lugar a pérdidas en las recuperaciones de los PAHs.

Por consiguiente, y con motivo de no malgastar el tiempo en la evaporación de la gota de agua en la preparación de la muestra se han realizado las siguientes experiencias: a cuatro muestras patrones que poseen los 13 PAHs se han adicionado volúmenes crecientes de agua, 0, 50, 75 y 100 μl . Estos volúmenes de agua contienen en su intervalo de magnitud, el volumen de la gota de agua eluída del cartucho con el eluyente empleado en este estudio. A continuación se ha llevado el volumen de cada muestra a 1 ml con metanol y posteriormente se han agitado las muestras durante 5 min en ultrasonidos. Finalmente se ha aplicado el procedimiento 2.4.2.4.2.a. para el análisis cromatográfico de las cuatro muestras.

En las figuras 69 y 70, aparecen los cromatogramas

correspondientes a las muestras que contienen 0 y 0.75 μ l de agua respectivamente. Como puede observarse en dichos cromatogramas, la presencia de este volumen de agua no influye en el análisis cromatográfico de los PAHs. En los cuatro casos se obtienen valores muy próximos entre sí con

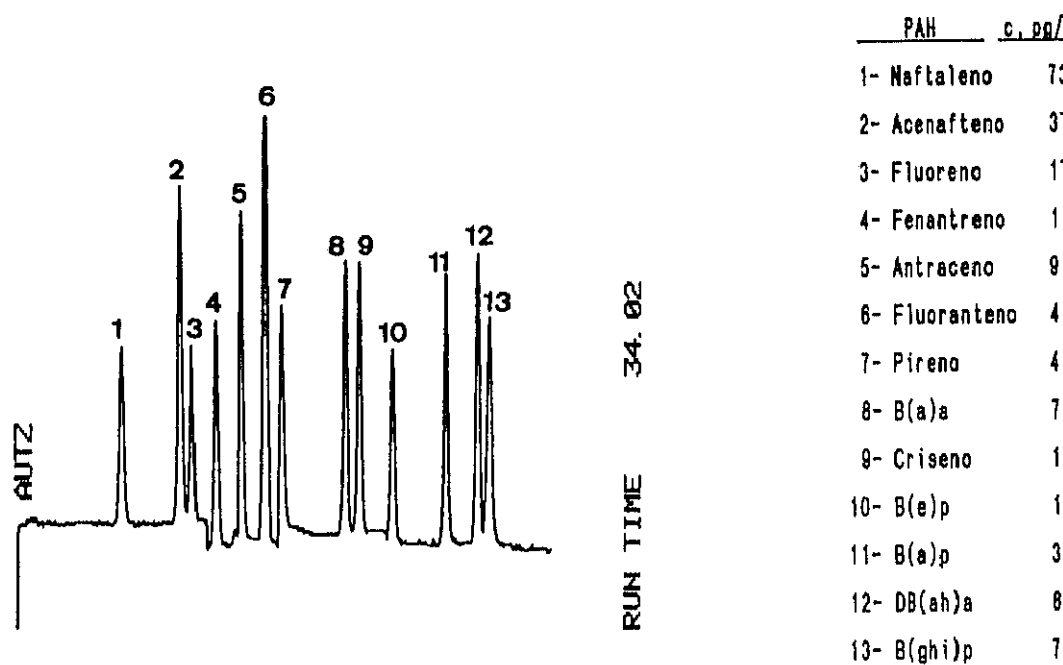


FIGURA 69: Cromatograma de HPLC de una muestra patrón de PAHs a la que no se ha adicionado agua

Columna: Hypersil Green PAH (100 x 4.6 mm). Temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/agua, véase tabla 36 (apartado 3.2.3.1.1.). Flujo: 1 ml/min. Detección: Fluorimétrica, véase tabla 37 (apartado 3.2.3.1.1.). V. inyección: 20 μ l.

desviaciones estándar relativas inferiores al 9%, lo cual significa que el error que puede cometerse sin efectuar la evaporación del pequeño volumen de agua es mínimo, teniendo en cuenta los niveles de concentraciones de los PAHs ensayados.

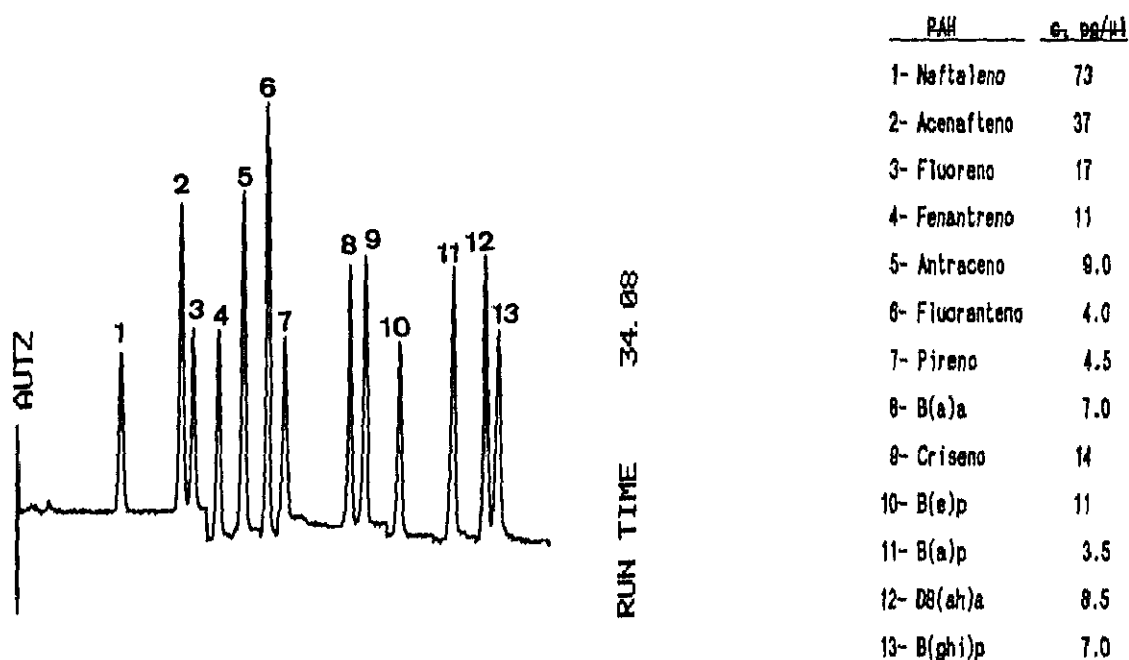


FIGURA 70: Cromatograma de HPLC de una muestra patrón de PAHs a la que se ha adicionado 75 μ l de agua

Columna: Hypersil Green PAH (100 x 4.8 mm). Temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/agua, véase tabla 38 (apartado 3.2.3.1.1.). Flujo: 1 ml/min. Detección: Fluorimétrica, véase tabla 37 (apartado 3.2.3.1.1.). V. inyección: 20 μ l.

A través de este estudio se han optimizado las variables siguientes:

- Naturaleza y volumen de eluyentes, (3+1) ml de dietil éter.
- Volumen de muestra de agua 1500 ml.

Hay que indicar que los valores más bajos de las recuperaciones corresponden a los PAHs de bajo y alto peso molecular debido a la volatilidad que presentan los primeros y a la baja solubilidad en agua que poseen los segundos (291).

3.2.4.3.2. Comparación del método propuesto con el recomendado por la EPA 525

Para ello, en este estudio se han efectuado tres experiencias. La primera se ha realizado exactamente como propone la EPA, método 525 (292), donde se determinan conjuntamente compuestos organoclorados y PAHs en agua potable, siendo el volúmen de muestra recomendado de 1 litro y el tipo de cartucho C18, 1000 mg. La segunda se ha realizado exactamente igual pero sustituyendo el tipo de cartucho por el utilizado en este estudio. La última se ha llevado a cabo siguiendo el método que se propone en este estudio.

En las figuras 71, 72 y 73, se presentan los cromatogramas obtenidos en las tres experiencias. Los resultados se indican en la tabla 57. Las recuperaciones que se obtienen aplicando el método de la EPA son inferiores para la mayoría de los PAHs, a las obtenidas por

el método propuesto excepto para el antraceno, criseno y benzo(a)pireno.

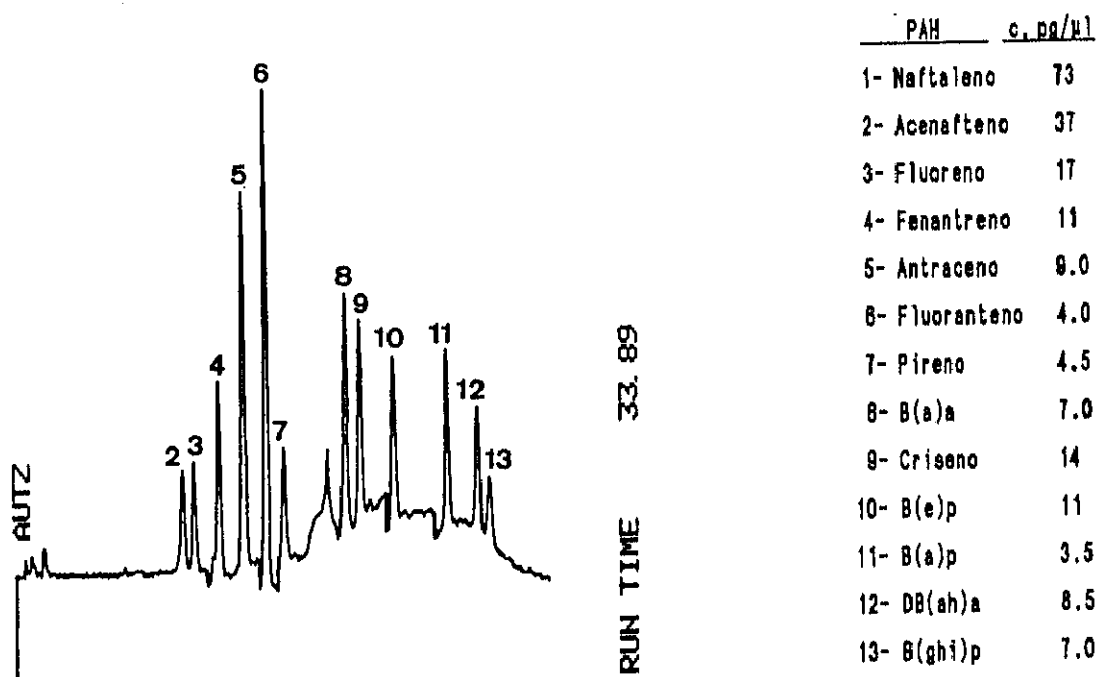
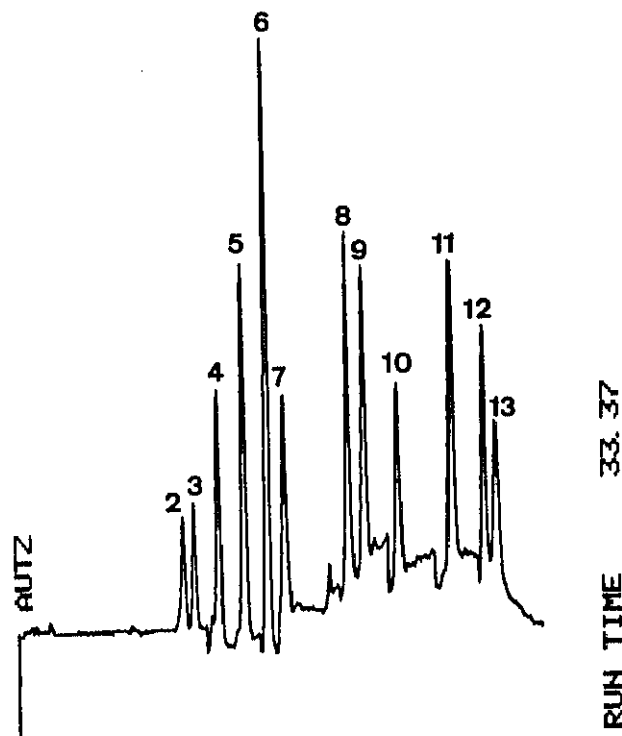


FIGURA 71: Cromatograma de HPLC de una muestra patrón aplicando el método EPA (cartucho C18, 1000 g).

Columna: Hypersil Green PAH (100 x 4.6 mm). temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/agua, véase tabla 36 (apartado 3.2.3.1.1.). Caudal: 1 ml/min. Detección: Fluorimétrica, véase tabla 37 (apartado 3.2.3.1.1.) V. inyección: 20 µl.



PAH	c. pp/L
1- Naftaleno	73
2- Acenafteno	37
3- Fluoreno	17
4- Fenantreno	11
5- Antraceno	9.0
6- Fluoranteno	4.0
7- Pireno	4.5
8- B(a)a	7.0
9- Criseno	14
10- B(e)p	11
11- B(a)p	3.5
12- DB(ah)a	8.5
13- B(ghi)p	7.0

FIGURA 72: Cromatograma de HPLC de una muestra patrón aplicando el método EPA (cartucho C18, 500 g).

Columna: Hypersil Green PAH (100 x 4.6 mm). temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/agua, véase tabla 36 (apartado 3.2.3.1.1.). Caudal: 1 ml/min. Detección: Fluorimétrica véase tabla 37 (apartado 3.2.3.1.1.). V. inyección: 20 µl.

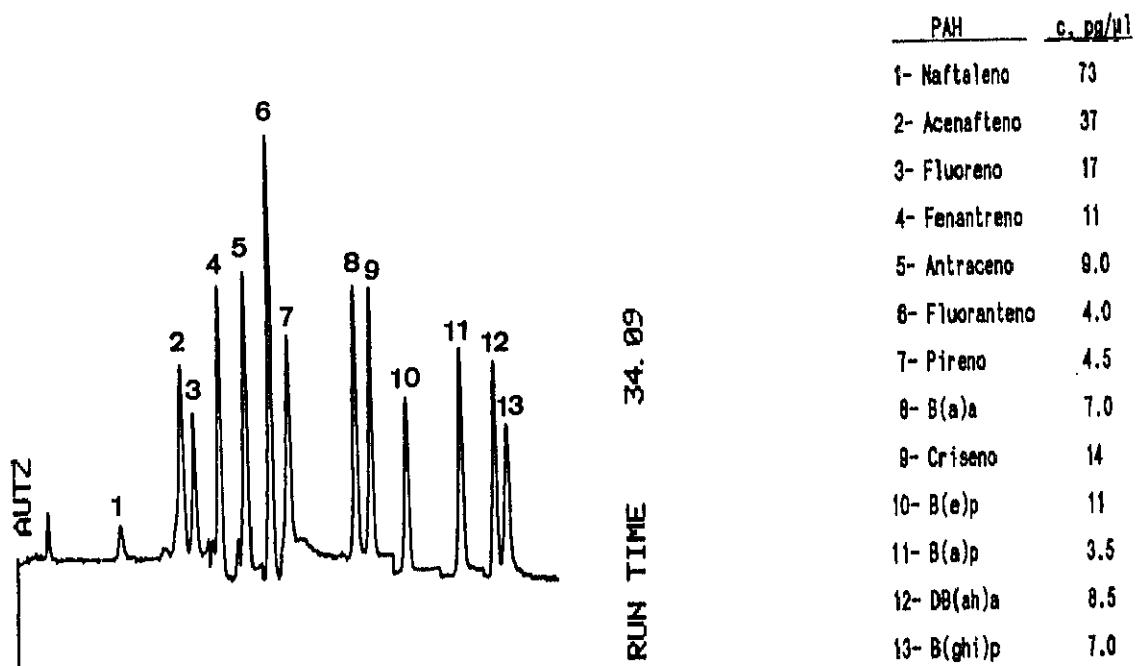


FIGURA 73: Cromatograma de HPLC de una muestra patrón aplicando el método propuesto

Columna: Hypersil Green PAH (100 x 4.6 mm). temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/agua, véase tabla 38 (apartado 3.2.3.1.1.). Caudal: 1 ml/min. Detección: Fluorimétrica véase tabla 37 (apartado 3.2.3.1.1.). V. inyección: 20 μl.

TABLA 57

Comparación del método propuesto con el recomendado por la EPA 525.

No	PAHs	c, ng/ μ l	Recuperaciones ¹ , %		
			1	2	3
1	Naftaleno	1.46	-	-	15
2	Acenafteno	0.73	19	41	65
3	Fluoreno	0.33	36	59	72
4	Fenantreno	0.21	60	96	96
5	Antraceno	0.18	85	96	71
6	Fluoranteno	0.08	86	116	95
7	Pireno	0.09	65	74	90
8	B(a)a	0.14	87	108	95
9	Criseno	0.27	87	87	76
10	B(e)p	0.22	82	95	85
11	B(a)p	0.07	92	76	67
12	Db(ah)a	0.17	57	84	66
13	B(ghi)p	0.14	55	62	60

¹ Valores medios correspondientes a dos determinaciones.

1 Método EPA 525.

2 Método EPA 525 con cartucho μ C18, 500 mg.

3 Método propuesto.

Se puede observar que la línea base de los cromatogramas, de las figuras 71 y 72, presenta deriva que puede afectar a la duración de la columna analítica. Por otra parte aparece un nuevo pico cromatográfico no identificado que podría ser debido a la disolución de parte del adsorbente dado el alto volumen de eluyente empleado, 12 ml de cloruro de metileno.

Por otra parte, como se ha indicado anteriormente, no

hay que olvidar que el método de la EPA 525 se recomienda para la determinación conjunta de compuestos organoclorados y PAHs por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC/MS).

Finalmente cabe resaltar que debido a las características del cartucho utilizado en este estudio, la preconcentración de la muestra es mucho más rápida, del orden de 20 minutos de duración, que cuanto ésta se lleva a cabo aplicando el método 525 de la EPA, cuya duración es del orden de 100 minutos.

3.2.4.3.3. Determinación de PAHs por HPLC en agua potable

Se ha aplicado el método propuesto a la determinación de los PAHs en dos tipos de agua potable, agua de grifo y agua bruta de embalse, cuya procedencia está especificada en el apartado 2.3.3. Para ello se han seguido los procedimientos especificados en los apartados 2.4.3.3. y 2.4.2.4.2.a. para la preparación de la muestra y determinación de los PAHs.

3.2.4.3.3.1. Agua del grifo

Se han analizado tres muestras de agua de grifo tomadas en esta Facultad. En ninguna de las muestras se han detectado PAHs, como queda reflejado en el cromatograma que aparece en la figura 74 correspondiente a una de las muestras analizadas.



FIGURA 74: Cromatograma de HPLC obtenido en el análisis de una muestra de agua de grifo

Columna: Hypersil Green PAH (100 x 4.6 mm). temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/agua, véase tabla 36 (apartado 3.2.3.1.1.). Caudal: 1 ml/min. Detección: Fluorimétrica véase tabla 37 (apartado 3.2.3.1.1.). V. inyección: 20 µl.

3.2.4.3.3.2. Agua bruta de embalse

Se han analizado distintas muestras de agua bruta de embalse, procedentes de tres zonas diferentes de la provincia de Madrid.

A continuación en las figuras 75, 76 y 77 se presentan los cromatogramas resultantes de la determinación de los PAHs en el agua de cada uno de los tres embalses.

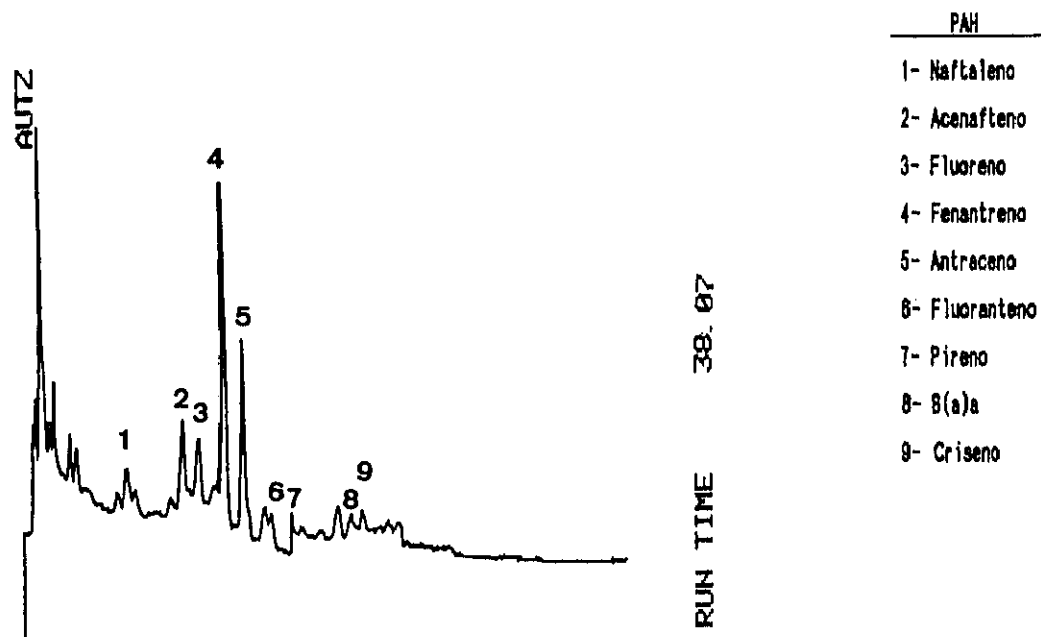


FIGURA 75: Cromatograma de HPLC obtenido en el análisis de una muestra de agua del embalse de Picadas.

Columna: Hypersil Green PAH (100 x 4.6 mm). temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/agua, véase tabla 36 (apartado 3.2.3.1.1.). Caudal: 1 ml/min. Detección: Fluorimétrica véase tabla 37 (apartado 3.2.3.1.1.). V. inyección: 20 µl.

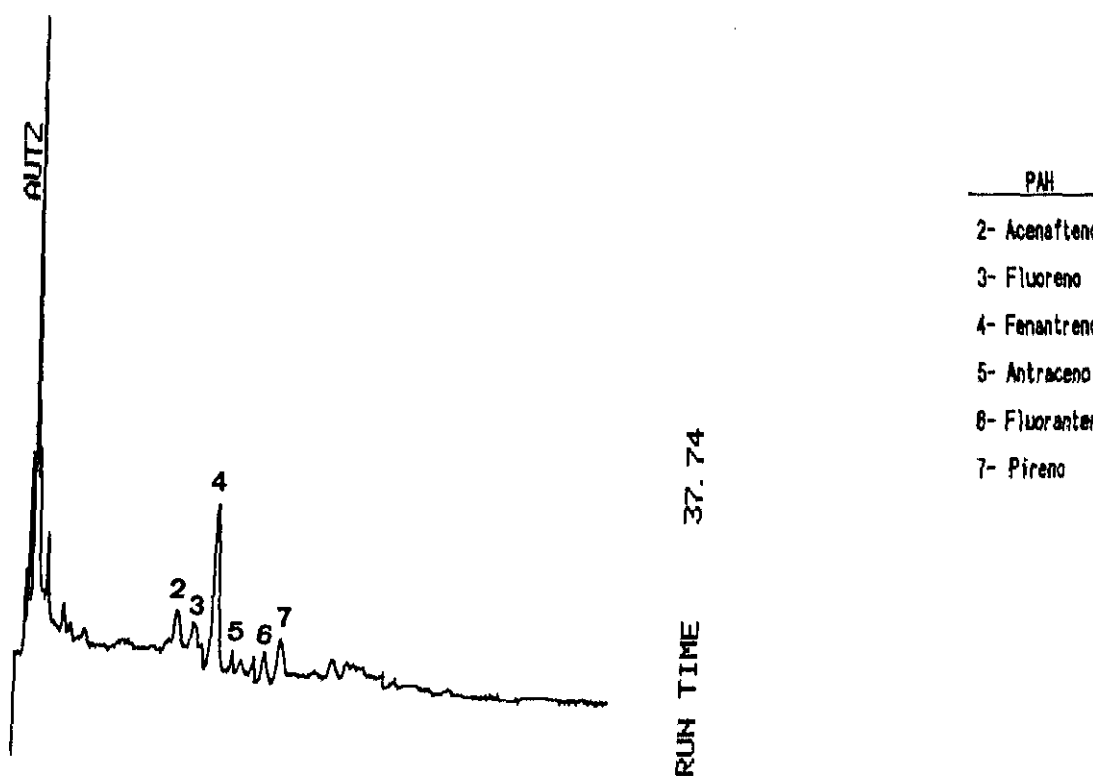


FIGURA 76: Cromatograma de HPLC obtenido en el análisis de una muestra de agua del embalse de La Pinilla.

Columna: Hypersil Green PAH (100 x 4.6 mm). temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/agua, véase tabla 36 (apartado 3.2.3.1.1.). Caudal: 1 ml/min. Detección: Fluorimétrica véase tabla 37 (apartado 3.2.3.1.1.). V. inyección: 20 µl.

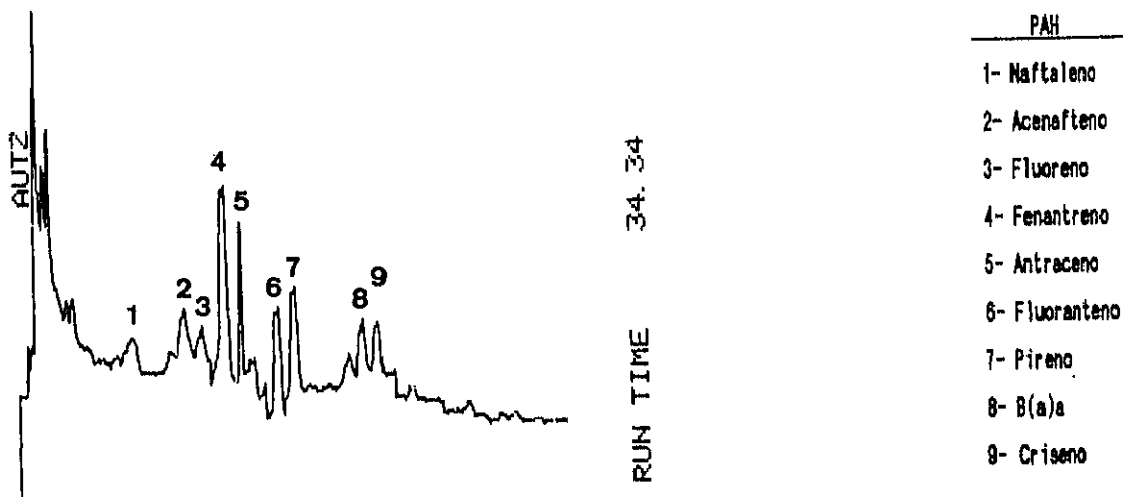


FIGURA 77: Cromatograma de HPLC obtenido en el análisis de una muestra de agua del embalse de Valmayor.

Columna: Hypersil Green PAH (100 x 4.6 mm). temp.: 22°C. Fase móvil: gradiente de ACN/agua, véase tabla 38 (apartado 3.2.3.1.1.). Caudal: 1 ml/min. Detección: Fluorimétrica véase tabla 37 (apartado 3.2.3.1.1.). V. inyección: 20 µl.

En la tabla 58 se indican los resultados obtenidos en el análisis. Como puede observarse, no se detectan los PAHs de mayor peso molecular que además son los más tóxicos. Los

TABLA 58

Determinación de PAHs por HPLC en muestras de agua de bruta de embalse.

PAHS	Muestra [†] , ($\mu\text{g l}^{-1} \times 10^{-3}$)		
	1	2	3
1- Naftaleno	4.8	-	31
2- Acenafteno	3.6	2.3	13
3- Fluoreno	2.0	1.3	6.7
4- Fenantreno	5.1	5.6	2.8
5- Antraceno	1.2	0.1	1.1
6- Fluoranteno	0.04	0.1	0.6
7- Pireno	0.1	1.1	0.8
8- B(a)a	0.1	-	1.1
9- Criseno	0.3	-	2.0
10- B(e)p	-	-	-
11- B(a)p	-	-	-
12- Db(ah)a	-	-	-
13- B(ghi)p	-	-	-

[†] Muestras tomadas en tres embalses (verano, 1993; 1: embalse de Picadas; 2: embalse de La Pinilla; 3: embalse de Valmayor)
Valores medios correspondientes a dos determinaciones.
(Límite máximo admisible: 0.2 $\mu\text{g/l}$)

contenidos del resto de los PAHs son bastante inferiores al límite máximo admisible, 0.2 µg/l (293).

Finalmente cabe resaltar que estos resultados son bastante lógicos, si se tiene en cuenta que los PAHs más pesados son bastantes insolubles en agua y tienden a depositarse bien en las partículas sólidas en suspensión, o bien en los sedimentos.

4. CONCLUSIONES

MÉTODOS FLUORIMÉTRICOS

1. La mayoría de los PAHs presentan emisión de fluorescencia más elevada en solución micelar de SDS que en metanol, especialmente en el caso del pireno que presenta un factor de sensibilización de 8.6.
2. Los límites de detección en solución micelar de SDS son particularmente bajos, destacando el benzo(a)pireno y pireno cuyos límites de detección son de 0.002 y 0.003 ng/ml respectivamente.
3. La determinación de pireno en medio micelar de SDS puede llevarse a cabo en presencia de acenafteno y fluoreno en relaciones PAH/analito 1000/1 con errores del 1.2% al nivel de ng/ml. En solución micelar de CTAB puede llevarse a cabo la determinación de pireno en presencia de acenafteno y fluoreno en relación 1000/1 con errores del 3.2 y 2.1% respectivamente. También en esa misma relación puede determinarse benzo(ghi)perileno en presencia de fenantreno, acenafteno, naftaleno y fluoreno en errores inferiores al 5%.
4. Los errores para las determinaciones en metanol son mayores que los obtenidos en medio micelar; concretamente, en la determinación de pireno en presencia de 1000 veces acenafteno o fluoreno, los errores son entre el 5 y el 54% superiores.
5. La determinación fluorimétrica de PAHs puede llevarse a cabo con desviaciones estándar relativas inferiores al 5% al nivel de ng/ml para todos los PAHs a

excepción de fenantreno en SDS y benzo(e)pireno en CTAB cuyas desviaciones estándar relativas son de 5.8 y 5.4%.

6. Es posible evaluar en muestras de aire particulado benzo(a)pireno, pireno y benzo(a)antraceno, en medio micelar de SDS, y benzo(a)pireno, pireno y benzo(ghi)perileno, en medio micelar CTAB. Los métodos propuestos pueden ser útiles en estudios ambientales ya que estos PAHs son muy representativos y pueden aplicarse a su determinación en muestras poco contaminadas.

ESTUDIO DE PAHs POR CLM ISOCRÁTICO

7. Por cromatografía líquida micelar en régimen isocrático es posible la separación de 5 PAHs, de los 13 estudiados, resultado que no es muy satisfactorio desde el punto de vista práctico. No obstante, los resultados han permitido profundizar en el conocimiento teórico de la cromatografía líquida micelar.

DETERMINACIÓN DE PAHs EN AIRE URBANO POR CLM EN GRADIENTE

8. La utilización de acetonitrilo/SDS en gradiente para la determinación de PAHs por HPLC y detección fluorimétrica conlleva un aumento de la sensibilidad y selectividad frente a la utilización de acetonitrilo/agua como fase móvil.

9. Con el método propuesto se consigue un ahorro del 35% de acetonitrilo lo que conlleva un menor consumo con implicaciones económicas y medioambientales beneficiosas.
10. Es posible la separación y cuantificación de 11 PAHs con desviación estándar relativa inferior al 7.5% a los niveles de concentración de 0.01-26 ng/ μ l.
11. El método puede proponerse como alternativo para la determinación de PAHs en muestras de aire urbano frente a otros ya existentes.

DETERMINACIÓN DE PAHs EN MUESTRAS DE AIRE URBANO Y AGUA POTABLE POR HPLC (Columna Green PAH)

12. El empleo de la columna específica de PAHs y del programa de nueve parejas de longitudes de onda de excitación/emisión permite la separación y cuantificación de los 13 PAHs con alta selectividad y sensibilidad.
13. Los límites de detección, se encuentran en el intervalo de 0.012 pg/ μ l para el fluoranteno y 0.45 pg/ μ l para el naftaleno.
14. La determinación de PAHs puede llevarse a cabo con desviaciones estándar relativas comprendidas entre 0.9 y 10% a los niveles de concentración de 0.028-0.87 ng/ μ l.
15. Debido a estas características analíticas, es

posible la determinación de PAHs en muestras de aire urbano sin necesidad de aplicar la etapa del clean-up. Los resultados son concordantes con los obtenidos por GC aplicando el método TO-13 recomendado por la EPA.

16. El método de extracción en fase sólida propuesto para la preconcentración de los PAHs en muestras de agua, permite manejar volúmenes de hasta 1500 ml por lo que es posible la determinación de PAHs en aguas superficiales.
17. La preconcentración de la muestra de agua mediante el cartucho utilizado se efectúa de forma más rápida que cuando se aplica el método 525 de la EPA.
18. El método propuesto es válido para la determinación de PAHs en muestras de agua potable.

DETERMINACIÓN DE BENZO(A)PIRENO EN MUESTRAS DE HUMO DE TABACO POR HPLC (Columna Ultraspher)

19. Puede llevarse a cabo la determinación de benzo(a)pireno, utilizando gradiente de acetonitrilo agua, con buena precisión, desviación estándar relativa del 5.3% y bajo límite de detección, de 24 ppt.
20. El método propuesto es muy selectivo para la determinación de benzo(a)pireno en muestras de humo de tabaco negro o rubio, con desviaciones estándar relativas del 5.3 y 6.3% respectivamente.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. National Academic Press. 1985, Chemical composition of petroleum hydrocarbon sources. Cap 1. pp 19-20. In Oil in the Sea: Inputs, Fates and Effects. Wash.D.C.
2. Perez García, M., *Química e Industria*, 1987, 33, 482-486.
3. Pucknat, A.W., Physical and chemical properties of PNA, 1981 pp 4-5, In Health Impacts of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. Environmental Health Review, nº 5. Ed. by Pucknat, A.W. Noyes Data Corporation N.Y.
4. Boubel, R.W. and Ripperton, L.A., *J. Air Pollut. Control Ass.*, 1963, 13, 553-557.
5. Grimmer, G., Environmental carcinogens: Polycyclic aromatic hydrocarbons, chemistry occurrence, biochemistry, carcinogenicity, 1983, Cap. 2, pp 28-30. Grimmer, G. Ed. CRC Press Inc. Boca Ratón, Florida.
6. Borneff, J.; Selenka, F.; Kunte, H. and Maximos, A., *Environ. Res.*, 1968, 2, 22-29.
7. Grimmer, G. and Duval, V., *Naturforsch*, 1970, 25b, 1171-1175.
8. Hase, A. and Hites, R.A., *Geochim. Cosmochim. Acta* 1976, 40, 549-555.
9. Ramdhal, T., *Nature*, 1983, 306, 580-582.
10. Wakehan, S.G., *Environ. Sci. Technol.*, 1977, 11, 272-276.
11. Laframme, R.E. and Hites, R.A., *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1978, 42, 289-304.

12. Daisey, J.M.; Cheney, J.L. and Liroy, P.J., *J. Air Pollut. Control Ass.*, 1986, 36, 17-33.
13. Grimmer, G.; Naujack, K.W. and Scheneider, D., Changes in PAHs profiles in different areas of a city during the year. In *Polynuclear aromatic hydrocarbons. Chemistry and Biological effects*. Bjorseth, a. and Dennis, A.J. Eds. Battelle Press. 1980.
14. Butler, J.D. and Crossley, P., *Atmos. Environ.*, 1981, 15, 91-94.
15. Masclet, P.; Mouvier, G. and Nikolau, K., *Atmos. Environ.*, 1986, 20, 430-446.
16. Sicré, M.A.; Marty, J.C.; Saliot, A.; Aparicio, X.; Grimalt, J. and Albaigés, J., *Atmos. Environ.*, 1987, 21, 2247-2259.
17. Suess, M.L., *Sci. Total Environ.*, 1976, 6, 239.
18. *Biologic Effects of Atmospheric Pollutans: Particulate Polycyclic Organic Matter*, Natl. Acad. Sci., Washington, D.C., 1972.
19. Thomas, J.F.; Mukai, M. and Tebbens, B.D., *Environ. Sci. Technol.*, 1968, 2, 33.
20. Katz, M. and Pierce, R.C., "Carcinogenesis- A Comprehensive Survey" Vol. 1: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, (Freudenthal, R. and Jones, P.W. Eds.), Raven, New York, 1976, P. 413.
21. Lao, R.C.; Thomas, R.S.; Oja, H. and Dubois, L., *Anal. Chem.*, 1973, 45, 908.
22. Lee, M.L.; Novotny, M. and Bartle, K.D., *Anal. Chem.*, 1976, 48, 1566.

23. Greenberg, A., *Atmos. Environ.*, 1989, 21, 2797-2799.
24. Muel, B. and Saguem, S., *Int. J. Env. Analyt. Chem.*, 1985, 19, 111-131.
25. Steinmetzer, H.C.; Baumeister, W. and Vierle, O., *Sci. Total Environ.*, 1984, 36, 91-96.
26. Katz, M.; Sakuma, T. and Ho, A., *Environ. Sci. Technol.*, 1978, 12, 1978.
27. Gordon, R.J. and Bryan, R.J., *Environ. Sci. Technol.*, 1973, 7, 1050-1051.
28. Suess, M.J., *Sci. Total Environ.*, 1976, 6, 239.
29. Harrison, R.M.; Perry, R. and Wellings, R.A., *Water Res.*, 1975, 9, 331.
30. Hites, R.A. and Biemann, W.G., *Adv. Chem.*, 1974, 46, 1663.
31. Blumer, M. and Youngblood, W.W., *Science*, 1975, 188, 53.
32. Giger, W. and Schaffner, C., *Anal. Chem.*, 1978, 50, 243.
33. Suess, M.J., *Zentralb. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. Reihe B.*, 1972, 155, 541.
34. Andelman, J.P. and Suess, M.J., "Organic Compounds in Aquatic Environments", Faust, S.J. and Hanter, J.V., Eds., 1971, pp. 439 Marcel Dekker, New York.
35. Bieri, R.H.; Cueman, M.K.; Smith, C.L. and Su, C.W., *Int. J. Environ. Anal. chem.*, 1978, 5, 293.

36. Hase, A. and Hites, R.A., *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1976, 40, 1141.
37. Blumer, M.; Souza, G. and Sass, J., *Mar. Biol.*, 1970, 5, 195.
38. Onuska, F.I.; Wolkoff, A.W.; Comba, M.E.; Larose, R.H.; Novotny, M. and Lee, M.L., *Anal. Lett.*, 1976, 9, 451.
39. Orr, W.L. and Grady, J. R., *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1967, 31, 1201.
40. Harrington, J.S. and Commins, B.T., *Chem. Ind.*, 1964, 1427.
41. Murdoch, J. and Geissman, T.A., *Am. Mineral.*, 1967, 52, 611.
42. Geissman, T.A.; Sim, K.Y. and Murdoch, J., *Experientia*, 1967, 23, 793.
43. Niauxsat, P.; Auger, C. and Mallet, L., *Hebd. C.R. Seances Acad. Sci. Ser. D.*, 1970, 270, 1042.
44. Aizenshtat, Z., *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1973, 37, 559.
45. Blumer, M., *Science*, 1965, 149, 722.
46. Sugleo, A.C., *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1978, 42, 1397.
47. Hodgson, G.W.; Hitchon, B.; Taguchi, K.; Baker, B.L. and Peake, E., *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1968, 32, 737.
48. Howard, J.W. and Fazio, T., *J. Agric. Food Chem.*, 1969, 17, 527.
49. Grimmer, G., *Dtsch. Apoth. Ztg.*, 1968, 108, 529.

50. Schmelztz, I. and Hoffman, D., "Carcinogenesis A Comprehensive Survey", Freudenthal, R.I. and Jones, P.W., Eds, 1976, vol. 1, pp. 225, Raven, New York.
51. Schlotzhauer, W.S. and Schmelts, I., Beitr. Tabakforsch., 1969, 5, 5.
52. Wynder, E.L. and Hoffmann, D., "Tobacco y Tobacco Smoke, Studies in Experimental Carcinogenesis", 1967, Academic Press, New York.
53. Stedman, R.L., Chem. Rev., 1968, 68, 153.
54. Hoffman, D. and Rathkamp, G., Anal. Chem., 1972, 44, 899.
55. Lee, M.L.; Novotny, M. and Bartle, K.D., Anal. Chem., 1976, 48, 405.
56. Severson, R.F.; Snook, M.E.; Arrendale, R.F. and Chortyk, O.T., Anal. Chem., 1976, 48, 1866.
57. Snook, M.E.; Severson, R.F.; Higan, H.C.; Arrendale, R.F. and Chortyk, O.T., Beitr. Tabakforsch., 1976, 8, 250.
58. Valerio, F. and Lazzarotto, A., Photochemical degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in real and laboratory conditions. In Fate of Hydrocarbons in The Environment: An Analytical Approach. 1986, Vol 10. pp 209-225. Albaigés, J. and Frei, R.W. eds. Gordon and Breach Science Publish.
59. Behymer, T.D. and Hites, R.A., Environ. Sci.Technol., 1985, 19, 1004-1009.
60. Behymer, T.D. and Hites, R.A., Environ. Sci.Technol., 1988, 22, 1311-1319.

61. Yokley, R.A.; Garrison, A.A.; Wehry, E.L. and Mamantov, G., *Environ. Sci. Technol.*, 1986, 20, 86-90.
62. Korfmacher, W.A.; Natusch, D.F.S.; Taylor, D.R.; Mamantov, G. and Wehry, E.L., *Science*, 1980, 207, 763-765.
63. Valerio, F.; Bottino, P.; Ugolini, D.; Cimberle, M.R.; Tozzi, G. and Frigerio, A., *Sci. Total Environ.*, 1984, 40, 169-188.
64. Huynh, C.K. and Vu Duc, T., *Lausanne*, 1986, April, 20-21.
65. Nielsen, T. and Seitz, B., *Atmos. Environ.*, 1984, 10, 2159-2165.
66. Masclet P. and Mouvier, G., *Pollution Atmospherique*, 1988, Jan-Mars, 25-31.
67. Pitts, J.N., Zielinska, B.; Sweetman, J.A.; Atkinson, R. and Winer, A.M., *Atmos. Environ*, 1985, 20, 911-915.
68. Sweetman, J.A.; Zielinska, B.; Atkinson, T.; Ramdahl, R.; Winer, A.M. and Pitts, J.N. Jr., *Atmos. Environ.*, 1986, 20, 235-238.
69. Zielinska, B.; Arey, J.; Atkinson, R. and Mc Elroy, P.A., *Environ. Sci. Technol.*, 1988, 22, 1044-1048.
70. Zielinska, B.; Arey, J.; Atkinson, R. and Winer, A.M., *Atmos. Environ.*, 1989, 23, 223-229.
71. König, J.; Balfanz, E.; Funcke, W.; Romanowski, T., *Anal. Chem.*, 1983, 55, 594-599.
72. Ramdahl, T., *Environ. Sci. Technol.*, 1983, 17, 666-670.
73. Kamens, R.M.; Fulcher, J.N. and Guo Zhishi, *Atmos. Environ.*,

1986, 20, 1579-1587.

74. Redding, S.B.; Mill, J.; Gould, C.W.; Lin, P.H.; Johnson, H.L.; Bombager, D.C. and Fojo, C.B., U.S. The environmental fate of selected polynuclear aromatic hydrocarbons. Environmental Protection Agency, Publication NO EPA- 560/5-75-009, Washington D.C., 1976, pp.122.
75. Gibson, P.T., "Biodegradation of aromatic petroleum hydrocarbons. In: Wolfe D.A., Ed, Fate and effects of petroleum hydrocarbons in marine ecosystems and organisms, Pergamon Press. New York, 1977, pp. 36-46.
76. Dipple, A.; Moschel, R.C. and Bigger, C.A.H., Chemical Carcinogens, E.C. Searle, E.C., Ed., 2nd edi., ACS, Monography 182, Vol. 2, 1984, pp. 41-164.
77. Ames, B.N.; Mc Caan, J. and Yamasaki, E., *Mutat. Res.*, 1974, 113, 347-364.
78. Van Houdt, J.J., *Atmos. Environ.*, 1990, 24b, 207-220.
79. Grimmer, G., PAH-Their contributions to the carcinogenicity of various emissions. In *Fate of Hydrocarbons in The Environment. An Analytical Approach*. Ed by J. Albaigés and R.W. Frei., Vol. 10, Gordon and Breach Science Publishers, New York. 1986.
80. Kauss, P.B. and Hutchinson, T.C., *Environ. Pollu.*, 1975, 9, 157-174.
81. Connell, D.W. and Miller, G.J., *CRC. Critical*, 1981.
82. GoeI, K.A. and Gasg, V., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1980, 189, 295-297.

83. VO-DINH, T., Chemical analysis of polycyclic aromatic compounds, Wiley, J. and Sons, New York, 1989.
84. Environmental Protection Agency. (EPA), Documento Nº 440/5-80-069.
85. Deyo, J.; Toma, J. and King, R.B., J. Air Pollut. Control Ass., 1977, 27, 142-144.
86. Chahal, H.S. and Romano, D.J., J. Air Pollut. Control Ass., 1976, 26, 885-886.
87. Hales, J.M., Atmos. Environ., 1972, 6, 635-659.
88. March, A.R.W., Atmos. Environ., 1978, 12, 401-406.
89. Cautreels, W. and Cauwenberghe, K., Atmos. Environ., 1978, 12, 1133-1141.
90. Liroy, P.J., Community air sampling strategies. Cap. 25, 236-398, In Advances in Air Sampling. 1989, Lewis Publishers inc. ISBN 0-87371-115-7.
91. Clayton, P. and Davis, B., Analytical Proceedings, 1989, 26, 284-285.
92. Woodget, B.W., Analytical Proceedings, 1989, 26, 283-284.
93. Pfo, C.A., General Samplig Techniques. Cap. 1. In Handbook of air pollution analysis. Harrison, R.M. and Perry, R. Chapman and Hall.
94. Adams, D.F. and Farwell, S.O., Sampling and analysis. In Air Pollution, 1986, Vol. 7, Cap. 2, pp. 78-79, Stern, J. Ed.

Academic Press.

95. Noll, K.E.; Miller, T.L.; Norco, J.E. and Reufter, R.K., *Atmos. Environ.*, 1977, 11, 1051-1059.
96. Munshi, U. and Patil, R.S., *Atmos. Environ.*, 1982, 16, 1915-1918.
97. Seinfeld, J.H., *Atmos. Environ.*, 1972, 6, 847-858.
98. Patterson, R.K., *J. Air Pollut. Control Ass.*, 1980, 30, 169-171.
99. Routine analytical cigarette-smoking machine - Definitions and standard conditios. International Standard. Norma ISO 3308: 1991(E).
100. B.O.E., No 17, 20 Ene., 1982, 1278-1281.
101. Wedding, J.B.; Welgand, M.A. and Carney, T.C., *Environ. Sci. Technol.*, 1982, 16, 602-606.
102. Federal Register (USA). Reference method for the determination of suspended particulate matter in the atmosphere (High Volume Method). Vol 47, No 48(6/12/1982), 40 CFR part 50.
103. Smith, J. And Surperenant, N., Retema., *Proceedings of the American Society of Testing Materials*, 1953, 53, 1122-1133.
104. Environmental Protection Agency (EPA). Atmospheric Sampling. 2nd. ed. intorm. No 450/2-80-004. APTi (MD-20). Environmental Reseach Center Triangle Park N.C. 27711.
105. Pierce, R.C. and Katz, M., *Anal. Chem.*, 1975, 47, 1743-1747.
106. Fox, M.A. and Staley, S.W., *Anal. Chem.*, 1976, 48, 992-998.

107. Merian, E., The environmental chemistry of volatile aromatic hydrocarbons. 1983, pp. 167-175. In Chemistry and Analysis of Hydrocarbons in the Environment. J. Albaigés; Frei, R.W. and Merian, E. Eds. Vol 5. Gordon and Breach Science Publishers.
108. Grimmer, G., Environmental carcinogens: Polycyclic aromatic hydrocarbons. Chemistry, occurrence, biochemistry, carcinogenicity. Cap. 2, Chemistry of PAHs, 1983, pp. 42-43. Grimmer, G. Ed. CRC Press. Inc. Boca Raton. Florida.
109. Bejoy, S.D. and Tomas, G.H., *Anal. Chem.*, 1978, 50, 967-973.
110. Nielsen, T., *J. of Chromatog.* 1979, 170, 147-156.
111. Muller, J. and Rohbook, E., *Talanta*, 1980, 27, 673-675.
112. Giger, W. and Schaffner, C., *Anal. Chem.*, 1978, 50, 243-249.
113. Grosgean, D., *Anal. Chem.*, 1975, 47, 797-805.
114. Hill, H.H.Jr.; Chan, K.W. and Karasek, F.W., *J. of Chromatog.*, 1977, 131, 245-252.
115. Gordon, R.V., *Atmos. Environ.*, 1974, 8, 189-191.
116. Masclet, P.; Pistikopoulos, P.; Beyne, S. and Mouvier, G., *Atmos. Environ.*, 1988, 22, 639-650.
117. Stenberg, U.R.; Alsberg, T.E., *Anal. Chem.*, 1981, 53, 2067-2072.
118. Lyall, R.J.; Hooper, M.A. and Mainwaring, S.J., *Atmos. Environ.*, 1988, 22, 2549-2555.
119. Brodding, G.; Van Vaeck, L. and Van Cauwenberghe, K., *Atmos.*

- Environ., 1977, 11, 1961-1964.
120. Cautreels, W. an Van Cauwenberghe, K., J. of Chromatog., 1977, 131, 253-264.
121. Laudmayr, E.P. and Müller, K., J. of Chromatog., 1979, 170, 130-166.
122. Golden, C.; Sawicki, E., Intern. J. Environ. Anal. Chem., 1975, 4, 9-23.
123. Griest, W.H.; Catón, J.E.; Guerin, M.R.; Yeatts, L.B.Jr. and Higgins, C.E., Anal. Chem., 1980, 52, 199-201.
124. Seifert, B. and Steinbach., Fresenius Z. Anal. Chem., 1977, 287, 264-270.
125. Nielsen, T., Atmos. Environ., 1988, 22, 2249-2254.
126. Griest, W.H.; Tohkins, B.A. and Caffrey, J.R., Anal. Chem., 1988, 60, 2169-2171.
127. Hugh Mc.; Mack, A. and Krukonis, V.J., Supercritical fluid extraction. Principles and practice. Butterworths Eds. Boston. 1986.
128. Khorassani, M.A.; Kumar, M.L.; Koebler, D.J. and Williams, G.P., J. of Chromatogr. Sci., 1990, 28, 599-604.
129. Wright, B.W.; Wright, C.W.; Gale, R.W. and Smith, R.D., Anal. Chem., 1987, 59, 34-44.
130. Campbell, R.M. and Lee, M.L., Anal. Chem., 1986, 58, 2247-2251.

131. Hawthorne, S.B. and Miller, D.J., *Anal. Chem.*, 1987, 59, 1705-1708.
132. Ndiomu, P.D. and Simpson, C.F., *Analytical Proceedings*, 1989, 26, 393-394.
133. American Society for Testing and Materials (ASTM). Norma D. 26882-71.
134. National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH). *Métodos* 183, 184 y 206.
135. Hoffman, D. and Wynder, E., *Anal. Chem.*, 1960, 32, 205-298.
136. Grimmer, G. and Bohnke, H., *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 1972, 261, 310-314.
137. May, W.E.; Chester, S.N.; Hertz, H.S.; Hilpert, L.R.; Rebbert, R.E.; Vogt, C.R. and Wise, S.A., Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in air particulate extracts by liquid, gas chromatographic methods. 1984, Cap. 13, pp. 197 - 229. In *Identification and Analysis of Organic Pollutants in Air*. Keith, L.H. Ed. Butterworth Publishers.
138. Lunde, G. and Björnsenth, A., *Nature*, 1977, 268, 518-519.
139. Jaklin, J. and Krenmayr, P., A routine method for the quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air. In *Fate of hydrocarbons in the environment. An analytical approach*. J. Albaigés, R.W. Frei Eds. 1986, Vol 10, Gordon and Breach Sciences Publishers.
140. Pérez, R.M.; Campos, A. y González, D., *Química Analítica Ambiental*, 0109-1, 1992.

141. Scott, R.P.W. and Kucera, P., *J. of Chromatogr. Sci.*, 1975, 13, 337-346.
142. Later, D.W.; Wilson, B.W. and Lee, M.L., *Anal. Chem.*, 1985, 57, 2979-2984.
143. Poole, F.P., Schuette, S.A., "Contemporary Practice of Chromatography", Elsevier, 1984.
144. Liska y col., *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1989, 12 (9), 577.
145. Eisenberg, W.C., *J. of Chromatogr. Sci.*, 1978, 16, 145-151.
146. Davies, I.L.; Bartle, K.; Williams, P.T. and Andrews, G.E., *Anal. Chem.*, 1988, 60, 204-209.
147. Ruckmick, S.C.; Hurtubise, R.J., *J. of Chromatog.*, 1985, 321, 343-352.
148. Miguel, A.H. and De Andrade, J.B., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 1989, 35 (1), 35 - 41.
149. Xia, L.; Zhu, M.; Tao, F. and Hu, Z., *Fenxi Huaxue*, 1988, 16 (2), 146 -149.
150. Department of the Environment (UK), *Methods Exam. Waters Assoc. Mater.*, 1988. pp 45.
151. Stijve, T. and Hischenhuber, C., *Stsch. Lebnsn. Rundsch.*, 1987, 83 (9), 276 - 282.
152. Joe, F.L.; Salernme. J. and Fazio, T., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1982, 65 (6), 1395-1402.

153. Lawrence, J.F. and Das, B.S., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 1986, 24 (2), 113 - 131.
154. Lebo, J.A. and Smith, L.M., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1986, 69 (6), 944 - 951.
155. Cavelier, C., *Analisis*, 1980, 8 (2), 46 - 48.
156. Szepesy, L. and Czencz, M., *Period. Polytech., Chem. Eng.*, 1980, 24 (2-3), 123 - 137.
157. Joe, F.L.; Roseboro, E.L. and Fazio, T., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1981, 64 (3), 641 - 646.
158. White, J.D., *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1985, 46 (6), 299 - 302.
159. Takuya; K.Y. and Goto, S., *Bunseki Kagaku*, 1981, 30(6), 362-368.
160. Krajewski, J. and Lipski, K., *Chem. Anal. (Warsaw)*, 1981, 26 (3), 431 - 435.
161. Giam, C.S.; Trujillo, D.A.; Kira, S. and Hrung, Y., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1980, 25 (5), 824 - 827.
162. Mathieu, F.; Chalabreysse, J. and Archimbaud, M., *Analisis*, 1985, 13 (7), 324 - 328.
163. Kodama, Y.; Anashidani, K. and Yoshikawa, M., *J. Chromatogr.*, 1983, 261 (1), 103 - 110.
164. Durand, J.P. and Petroff, N., *J. Chromatogr.*, 1980, 53 (7), 971-975.
165. Lagana, A.; Petronio, B.M. and Rotatori, M., *J. Chromatogr.*,

- 1980, 198 (2), 143 - 149.
166. Guyot, B.; Lahmy, S. and Vincent, J.C., *Cafe Cacao. the*, 1982, 26 (3), 199 - 206.
167. Musial, C.J. and Uthe, J.F., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1986, 69 (3), 462 - 466.
168. Maher, W.; Pellegrino F.; Furlonger, J., *Chem. Anal. Group, Sch. Appl. Sci Canberra Coll. Advanced Educ., Belconnen, A.C.T.2616, Australia. Microchem. J.*, 1989, 39 (2), 160 - 165.
- 169,176. Núñez, M.D. and Centrich, F., *Anal. Chim. Acta*, 1990, 234 (1), 269 - 273.
170. Gkicinski, H.; Adamek, S. and Kettrup, A., *GIT Fachz. Lab.*, 1989, 33 (12), 1225 - 1228.
171. Janseen, F. and Kanif, J., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 1982, 13 (1), 29 - 36.
172. Roach, M.C. and Harmony, M.D., *J.Chromatogr.*, 1988, 455,332-335.
173. Voigtman, E. and Winefordner, J.D., *J. Liq. Chromatogr.*, 1982, 5 (11), 2113 - 2122.
174. Bazylak, G. and Masłowska, J., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1990, 336 (3), 205-209.
175. Saito, T., *Bunseki Kagaku*, 1990, 39 (4), 211-215.
177. Kicinski, H.G.; Adamek, S. and Kattrup, A., *SLZ, Schweiz. Lab.-Z.*, 1990, 47 (4), 152-154.

178. Ruban, V.F. and Anisimova, I.A., *Zh. Anal. Khim.*, 1991, 46 (10), 2035-2040.
179. Escriva, C.; Morales, M.; La Orden, A.; Manes, J. and Font, G., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1991, 339 (10), 743 - 745.
180. Salagoity, M.H.; Gaye, J.; Tricard, C.; Desormeaux, M.N. and Sudraud, P., *Sci. Aliments*, 1990,10 (4), 785 - 796.
181. Armstrong, D.W.; Hinze, W.L.; Bui, K.H. and Singh, H.N., *Analytical Letters*, 1981, 14 (A19), 1659 - 1667.
182. Baek, S.O.; Goldstone, M.E.; Kirk, P.W.W.; Lester, J.N. and Perry, R., *Environ. Technol.*, 1991, 12 (2), 107 - 129.
183. Thompson, D.; Jolley, D. and Maher, W., *Microchem. J.*, 1993, 47 (3), 351-362.
184. Perrin, J.L.; Poirot, N.; Liska, P.; Thienpont, A. and Felix, G., *Tett Wiss. Technol.*, 1993, 95 (2), 40-51.
185. Gerlich, W.; Martin, G, and Panning, H., *LaborPraxis*, 1991, 15 (11), 942-944.
186. Perfetti, G.A.; Nyman, P.J.; Fisher, S.; Joe, F.L.; and Diachenko, G.W., *J. AOAC Int.*, 1992, 75 (5), 872-877.
187. Ares, J. and Zavatti, J., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1993, 50 (3), 333-339.
188. Euston, C. and Baker, D., *GIT Fachz. Lab.*, 1979, 23 (9), 827-828, 831 - 834.
189. Quilligan, M.A. and Sim, P.G., *J. Chromatogr. Sci.*, 1988, 26 (4),

160 - 167.

190. Dong, M. and Greenberg, A., *J. Chromatogr.*, 1988, 11 (9-10), 1887 - 1905.
191. Fischer, R., *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 1982, 311 (2), 109 - 111.
192. Brandys, J.; Lipniak, M. and Piekoszewski, W., *Chem. Anal.*, 1989, 34 (3-4), 449 - 452.
193. Van der Elst, D.J.D., *Spectra 2000*, 1991, 159, 51 - 52.
194. Rousset, R.; Allaire, M. and Friar, R.S., *J. Air Waste Manage. Assoc.*, 1992, 42 (12), 1609-1613.
195. Eiceman, G.A. and Lindley, K., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 1988, 32 (1), 29 - 48.
196. Meier, P. and Aubert, J.D., *Mitt. Geb. Lebensmittelunters, Hyg.*, 1988, 79 (4), 433 - 439.
197. Daishima, S.; Iida, Y.; Shibata, A. and Juruya, K., *Bunseki Kagaku*, 1983, 32 (12), 761 - 765.
198. Binnermann, P.H., *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1979, 179 (6), 452 - 477.
199. Hilpert, L.R.; Byrd, G.D. and Vogt, C.R., *Anal. Chem.*, 1984, 56 (11), 1842 - 1846.
200. De Leeuw, J.W.; De Leer, E.W.B.; Sinnighe Damste, J.S. and Schuyf, P.J.W., *Anal. Chem.*, 1986, 58 (8), 1852 - 1857.
201. Grimmer, G.; Naujack, K.W. and Schneider, D., *Frese. Z. Anal.*

- Chem., 1982, 311 (5), 475 - 484.
202. Spitzer, t. and Kuwatsuka, S., J. Chromatogr., 1986, 358 (2), 434 - 437.
203. González Bravo, L. and Rejthar, L., Int. J. Environ. Anal.Chem., 1986, 24 (4), 305 - 318.
204. Rainio, K.; Linko, R. and Ruotsila, L., Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1986, 37 (3), 343 - 377.
205. Knecht, U.; Laemmier, C. and Tobias, S., Fresenius Z. Anal. Chem., 1987, 326 (1), 25 - 32.
206. Speer, K.; Steeg, E.; Horstman, P.; Kuehn, T. and Montag, A., J. High Resolut. Chromatogr., 1990, 13 (2), 104 - 111.
207. Auer, W. and Malissa, H., Anal. Chim. Acta, 1990, 237(2), 451-457.
208. Chen, X. and Smart, R.B., J. Chromatogr. Sci., 1992, 30 (5), 192 - 196.
209. Pozhidaev, V.M. and Pozhidaeva, K.A., Zh. Anal. Khim., 1989, 44 (12), 2177-2179.
210. Laucas, F.M.; Matta, M.H.R.; Hayasida, L.J. and Carrilho, E., J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 1991, 14(9), 633-635.
211. Zhang, S. and Lin, Y., Sepu, 1991, 9 (4), 236-241.
212. Pandey, R.A.; Muthal, P.L.; Parhad, N.M. and Kumaran, P., Indian J. Environ. Health, 1991, 33 (1), 40-44.

213. Mangani, F.; Crescentini, G.; Sisti, E.; Bruner, F. and Cannarsa, S., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 1991, 45 (2), 89 - 100.
214. Morabito, P.L.; McCabe, T.; Hiller, J.F. and Zakett, D., *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1993, 16 (2), 90-94.
215. Maher, W.A., Bagg, J. and Smith, J.D., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 1979, 7 (1), 1 - 11.
216. Miguel, A. H., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 1982, 12 (1), 17-25.
217. Alekseeva, T.A.; Teplitskaya, T.A. and Del'vig, I.S., *Izv. Akad. Nauk. Gruz. SSR, Ser. Khim.*, 1986, 12 (13), 175 - 179.
218. Bunk, W.; Glueck, V.; Schuch, B. and Donnevert, G., *J. Planar Chromatogr. Mbs. TLC.*, 1989, 2 (1), 28 - 32.
219. Mori, Y.; Naito, S. and Matsushita, H., *Eisei Kagaku*, 1984, 30 (3), 111 - 118.
220. Sengupta, P. and Sil, S., *J. Oil Technol. Assoc. India*, 1983, 15 (3), 54 - 55.
221. Baralkiewicz, D. and Gramowska, H., *Chem. Anal.*, 1989, 34 (1), 149 - 153.
222. Robinson, J.L.; Marshall, M.A.; Draganjac, M.E. and Noggle, L. C., *Anal. Chem. Acta*, 1980, 115, 229 - 238.
223. Borkowska, M.M., *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.*, 1985, 36 (3), 262-268.

224. Modica, R.; Fiume, M. and Bartosek, I., *J. Chromatogr.*, 1982, 247 (2), 352 - 355.
225. Kacprzak, J.L.; Geyer, R. and Cooper, C., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1984, 67 (1), 106 - 108.
226. Krost, L.J., *Anal. Chem.*, 1985, 57 (3), 763 - 765.
227. Berthod, A.; Mellone, T.; Voigtman, E. and Winefordner, J.D., *Anal. Sci.*, 1987, 3 (5), 405 - 411.
228. Xi, X. and Yeung, E.S., *Anal. Chem.*, 1991, 63 (5), 490 - 496.
229. Mazzeo, J.R.; Krull, I.S. and Kissinger, P.T., *J. Chromatogr.*, 1991, 550 (1-2), 585-594.
230. Zuo, B.; Deng, Y. and Zeng, Y., *Feuxi Hxaxue*, 1991, 19 (4), 481-483.
231. Mitchell, C.E., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1979, 23(4-5), 669 - 676.
232. Furusawa, M.; Tachibana, M. and Fujimori, Y., *Bunseki Kagaku*, 1981, 30 (3), 181 - 184.
233. Furusawa, M. and Tachibana, M., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1981, 54 (10), 2968 - 2971.
234. Suenaga, S.; Shiraishi, Y.; Shirotori, T. and Kayanuma, S., *Eisei Kagaku*, 1981, 27 (4), 244 - 251.
235. Mori, Y.; Naito, S. and Matsushita, H., *Bunseki Kagaku*, 1986, 35 (6), 513 - 517.

236. Tachibana, M. and Furusawa, M., *Anal. Sci.*, 1985, 1 (1), 77-80.
237. Nithipatikom, K. and McGown, L.B., *Anal. Chem.*, 1986, 58 (14), 3145 - 3148.
238. Tachibana, M. and Furusawa, M., *Anal. Sci.*, 1987, 3(5), 457-461.
239. Saber, A.; Jarosz, J.; Martín-Bouyer, M.; Paturel, L. and Vial, M., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 1987, 28 (3), 171 - 184.
240. Jones, B.T.; Glick, M.R.; Mignardi, M.A. and Winefordner, J.D., *Appl. Spectrosc.*, 1988, 42 (5), 850 - 853.
241. Vershinin, V.I.; Vlasova, N.V.; Karyakin, A.V.; Kashlikova, B.V. and Smirnov, Y. N., *Zh. Anal. Khim.*, 1988, 43 (9), 1684-1690.
242. Carr, J.W. and Harris, J.M., *Anal. Chem.*, 1988, 60 (7), 698-702.
243. Korenman, Y.I. and Vorob'ev, V.A., *Zh. Prikl. Khim.*, 1990, 63 (4), 910 - 912.
244. Bark, K. and Force, R.K., *Appl. Spectrosc.*, 1990, 44 (8), 1373-1376.
245. Nithipatikom, K. and McGown, L.B., *Anal. Chem.*, 1988, 60 (10), 1043 - 1045.
246. Karyakin, A.V.; Smirnov, Y.N. and Vershinin, V.I., *Zh. Anal. Khim.*, 1988, 43 (4), 728 - 732.
247. Boutilier, G.D. and Winefordner, J.D., *Anal. Chem.*, 1979, 51 (9), 1384 - 1391.
248. Ramis Ramos, G.; Khasawneh, I.M.; García Álvarez-Coque, M.C. and

- Winefordner, J.C., *Talanta*, 1988, 35 (1), 41 - 46.
249. Vo-Dinh, T. and Lamotte, M., *Appl. Spectrosc.*, 1986, 42 (1), 65-68.
250. Karyakin, A.V. and Smirnov, Y.N., *Zh. Prikl. Spektrosk.*, 1988, 49 (5), 774 - 779.
251. Vo-Dinh, T.; Garmage, R.B. and Martinez, P.R., *Anal. Chim. Acta*, 1980, 118 (2), 313 - 323.
252. Vo-Dinh, T. and Hooyman, J.R., *Anal. Chem.*, 1979, 51 (12), 1915 - 1921.
253. Madison, R.T. and Carroll, M.K., *Appl. Spectrosc.*, 1989, 43 (3), 422 - 425.
254. Asher, S.A., *Anal. Chem.*, 1984, 56 (4), 720 - 724.
255. Torres, E.L. and Winefordner, J.D., *Anal. Chem.*, 1987, 59 (13), 1626 - 1632.
256. Doretto, L.; Maccioni, A.M. and Traldi, P., *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 1986, 13 (7), 381 - 385.
257. Macioni, A.M.; Traldi, P. and Doretto, L., *Talanta*, 1987, 34 (5), 483 - 487.
258. Vodzinskii, Y.V. and Tikhova, N. Y., *Zh. Anal. Khim.*, 1986, 41 (5), 911 - 915.
259. Nelson, A.; Auffret, N. and Reachen, J., *Anal. Chim. Acta*, 1988, 207 (1-2), 47 - 57.

260. Yu, T. and Winefordner, J.D., *Spectrosc. Lett.*, 1988, 21 (5), 465 - 476.
261. Glick, M.R.; Jones, B.T.; Smith, B.W. and Winefordner, J.D., *Appl. Spectrosc.*, 1989, 43 (2), 342 - 344.
262. Tachibana, M. and Furusawa, M., *Analyst*, 1990, 115 (11), 1495 - 1498
263. Vodzinskii, Yu.V.; Sidorova, T.I. and Shilina, A.I., *Zh. Anal. Khim.*, 1991, 46 (12), 2380-2388.
264. Attwood, D. and Florence, T. "Surfactants systems. Their chemistry, Pharmacy and biology". Chapman and Hall. New York, 1983.
265. Yoshikiyo, M. and Ryohei M., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1988, 61, 333-339.
266. Schulman, S.G. "Molecular luminescence spectroscopy. Methods and applications". Part I. John Wiley and Sons. New York. 1985, 1988.
267. Gernot Grummer Editor "Environmental Carcinogens: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons". CRC Press, Inc. 1983.
268. Moore, J.W. and Ramamoorthy, S. "Organic Chemicals in Natural Waters. Applied Monitoring and Impact Assessment". Edit. Springer-Verley. 1984.
269. Gschwend, P.M. *Environ. Sci. Technol*, 1982, 1, 16.
270. Lee, M.L.; Novotny, M. y otros: "Analytical Chemistry of Polycyclic Aromatic Compounds". Academic Press, New York, 1981.

271. Armstrong, D.W. and Henry, S.J., *J. Liq. Chromatogr.*, 1980, 3, 657.
272. Armstrong, D.W. and Nome, F., *Anal. Chem.*, 1981, 53, 1662.
273. Armstrong, D.W. and Stine, G.Y., *Anal. Chem.*, 1983, 55, 2317.
274. Landy, J.P. and Dorsey, J.G., *Anal. Chim. Acta*, 1985, 178, 179.
275. Bertnod, A. Girard, I., *Anal. Chem.*, 1986, 58, 1356.
276. Pelizzeti, E. and Pronauro, E., *Anal. Chim. Acta.*, 1985, 169, 1-29.
277. Pasupate, M. and Darol, J.M. "Critical Micelle Concentration of Aqueous Surfactant Systems" 1971, NSRDS-NBS 36.
278. Kirkbright, G. F. *Talanta*, 1966, 13,7.
279. EPA, Compendium of Methods for the Determination of Toxic Organic Compounds in Ambient Air, 600/4-89/017, June 1988.
280. Arunyanart, M. and Cline Love, L.J., *Anal. Chem.*, 1984, 56, 1557-1561.
281. Dorsey, J.G.; DeEchegaray, M.T. and Landy, J.S., *Anal. Chem.*, 1983, 55, 924.
282. Wells, M.J. and Clark, C.R., *Anal. Chem.*, 1981, 53, 1341-1345.
283. Borgerding, M.F.; Williams, R.L.; Hinze, W.L. and Qnina, F.H., *J. Liq. Chromatog.*, 1989, 12 (8), 1367-1406.
284. Melander, W.R.; Chen, B. and Horváth, C., *J. Chromatog.*, 1979,

185, 99.

285. Yarmchuk, P.; Weinperger, R.; Hirsch, S and Cline Lone, L.J., *Anal. Chem*, 1982, 54, 2233-2238.
286. Antonio, H.M. and Jailson, B.A., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 1989, 35, 35-41.
287. Muel, B. and Saguem, S. *Int., Env. Analyt. Chem.*, 1985, 19, 111.
288. Steinmetzer, H.C., Baumeister, W. and Vierle, O., *Sci. Total Environ.*, 1984, 36, 91.
289. Risner, C.H., *J. Chromatog. Sci*, 1988, 26, 113-120.
290. Snyder, L.R. and Kirkland, J.J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", John, W. and Sons, Inc. New York, 1979.
291. López García, A.; Blanco González, E.; García Alonso, J.I. and Sanz-Medel, A., *Anal. Chim. Acta*, 1992, 264 (2), 241-248.
292. Eichelberger, J.W.; Behymer, T.D. and Budde, W.L., *EPA, Method 525*, Revision 2.1, 1988.
293. B.O.E., Aguas. Reglamentación técnico-sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo Público. Nº 226, 20 septiembre, 1990.