

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**Extracción y preconcentración micelar.
Aplicación a la determinación de
hidrocarburos aromáticos policíclicos
en muestras de interés medioambiental**

Autor: Pino Estévez, Verónica

**Directores: Teresa María Borges Miquel
y Venerando González Díaz**

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología



**Departamento de Química Analítica,
Nutrición y Bromatología
Universidad de La Laguna**

TERESA MARÍA BORGES MIQUEL, Profesora Titular de Química Analítica y Directora del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de La Laguna,

INFORMA: Que la presente Memoria, titulada “EXTRACCIÓN Y PRECONCENTRACIÓN MICELAR. APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN MUESTRAS DE INTERÉS MEDIOAMBIENTAL”, que presenta la Lcda. Verónica Pino Estévez, para optar al Grado de Doctor en Química por esta Universidad, ha sido realizada en los laboratorios de este Departamento, bajo la dirección de los Dres. D. Venerando González Díaz y Dña. Ana María Afonso Perera.

Y para que conste, firmo el presente informe en La Laguna, a veintitrés de enero de dos mil dos.



**Departamento de Química Analítica,
Nutrición y Bromatología
Universidad de La Laguna**

VENERANDO GONZÁLEZ DÍAZ, Catedrático de Química Analítica, y ANA MARÍA AFONSO PERERA, Profesora Titular de Química Analítica de la Universidad de La Laguna

AUTORIZAN la presentación del trabajo “EXTRACCIÓN Y PRECONCENTRACIÓN MICELAR. APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN MUESTRAS DE INTERÉS MEDIOAMBIENTAL”, realizado por la Licenciada en Química Verónica Pino Estévez, para optar al Grado de Doctor en Química por la Universidad de La Laguna.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firman la presente en La Laguna, a veintitrés de enero de dos mil dos.

En primer lugar, quiero hacer constar mi más profundo agradecimiento a mis directores, Dr. Venerando González Díaz y Dra. Ana María Afonso Perera, sin los cuales la realización de esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible. A Venerando, agradezco muy especialmente su inmensa paciencia, su dedicación y su capacidad de aportar siempre nuevos enfoques. A Ana, el ser la auténtica guía de este trabajo, su constancia y su aprecio significan mucho para mí.

También quiero agradecer al Dr. Juan H. Ayala Díaz absolutamente todos y cada uno de los favores que aún le debo, y su constante apoyo en el laboratorio.

Al Servicio de Medio Ambiente de la Universidad de La Laguna, SEMALL, no sólo por su disponibilidad de instrumentos y materiales, sino por la calidad humana del equipo que lo integra. Muy especialmente agradecer la colaboración del Lcdo. Francisco J. Conde Hardisson, y de la Lcda. Eva María Rodríguez Martín.

A los compañeros del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, por el apoyo brindado, en especial a Clara Falcón, Dulce Rodríguez, al Dr. José Elías Conde, y a todos los doctorandos con quienes he compartido tantos cortados. Especialmente quisiera agradecer la ayuda de la Lcda. Lourdes Cárdenes Alonso.

Al Ministerio de Educación y Cultura, por la beca F.P.U. que me ha permitido llevar a cabo esta Tesis Doctoral.

Al Dr. Willie E. Hinze y todo el equipo departamental de química en Wake-Forest University, por la inestimable ayuda obtenida durante mi estancia en Estados Unidos.

A todos y cada uno de mis amigos, que han sido apoyo fundamental durante esta trayectoria. A Eva, Fran, Trini, Rafa, Sonia, Carlos, Moncef, Javi, Teyi, Miguel, Toni, Mary, Loli, Inma, Lourdes, María, Manolo, Juanma, Eduardo, Hemanta, Belén, y tantos otros, gracias a Dios.

A mis padres y hermanos, por el apoyo en todos los sentidos, y por el tiempo que les he robado para dedicárselo a la presente Tesis.

A Rafael, Lorena,

Montserrat y

Miguel Ángel,

mi familia.

A la amistad sincera,

y a la vida.

ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

I.1.-	HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS. CARACTERÍSTICAS E INTERÉS MEDIOAMBIENTAL	2
I.1.1.-	LOS HAPs EN EL MEDIO MARINO	6
I.1.2.-	CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN EN AGUAS Y SEDIMEN- TOS MARINOS	7
I.2.-	SISTEMAS MICELARES	8
I.2.1.-	CARACTERÍSTICAS GENERALES	8
I.2.2.-	PODER SOLUBILIZANTE DE LOS MEDIOS MICELARES	11
I.2.2.1.-	<i>Coefficientes de reparto micelar</i>	12
I.2.3.-	INTERÉS EN QUÍMICA ANALÍTICA	14
I.2.3.1.-	<i>Procesos de extracción</i>	15
I.2.3.2.-	<i>Separaciones cromatográficas</i>	15
I.2.3.3.-	<i>Métodos electroforéticos</i>	16
I.2.3.4.-	<i>Otras aplicaciones</i>	16
I.3.-	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17

**CAPÍTULO II: EXTRACCIÓN MICELAR DE HAPs, CONTENIDOS EN SEDIMENTOS
MARINOS, ASISTIDA POR MICROONDAS O ULTRASONIDOS.**

II.1.-	INTRODUCCIÓN	22
II.1.1.-	EXTRACCIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS DE MUESTRAS SÓLIDAS	22
II.1.1.1.-	<i>Extracción asistida por microondas (EAM)</i>	23
	- <i>Principios de la extracción asistida por microondas</i>	24
	- <i>Parámetros que afectan al proceso de extracción asistida por microondas</i>	27

	- Aplicaciones de la extracción asistida por microondas . . .	28
II.1.1.2.-	Extracción asistida por ultrasonidos (EAU)	31
	- Aplicaciones de la extracción asistida por ultrasonidos . . .	34
II.1.2.-	OBJETO DEL TRABAJO	36
II.2.-	PARTE EXPERIMENTAL	37
II.2.1.-	REACTIVOS	37
II.2.2.-	EQUIPOS	38
II.2.3.-	MATERIALES	39
	II.2.3.1.- Sedimentos y proceso de enriquecimiento en HAPs	39
	II.2.3.2.- Material de referencia certificado	40
II.2.4.-	MÉTODOS DE ANÁLISIS POR HPLC	40
II.2.5.-	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	42
	II.2.5.1.- Asistido por ultrasonidos (EAU)	42
	II.2.5.2.- Asistido por microondas (EAM)	42
II.3.-	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
II.3.1.-	EXTRACCIÓN DE HAPs CONTENIDOS EN SEDIMENTOS ENRIQUECIDOS	44
	II.3.1.1.- Condiciones cromatográficas para el análisis de HAPs en medio micelar	44
	II.3.1.2.- Extracción micelar asistida por ultrasonidos	48
	- Estabilidad de los HAPs	48
	- Optimización de las variables experimentales	49
	- Eficacia de la extracción	58
	- Influencia del tamaño de partícula del sedimento	59
	- Influencia de la mezcla de surfactantes	62
	- Influencia de la adición de electrolitos	64
	II.3.1.3.- Extracción micelar asistida por microondas	66
	- Estabilidad de los HAPs	66
	- Optimización de las variables experimentales	66

- <i>Influencia de la cantidad de muestra</i>	76
- <i>Extracciones simultáneas</i>	77
II.3.1.4.- <i>Comparación de los métodos de extracción asistida por microondas y por ultrasonidos</i>	79
II.3.2.- EXTRACCIÓN DE HAPs CONTENIDOS EN UN MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO	82
II.3.2.1.- <i>Análisis por HPLC</i>	82
II.3.2.2.- <i>Extracción de HAPs contenidos en el sedimento SRM 1941a.</i>	86
CAPÍTULO III: PRECONCENTRACIÓN DE HAPs MEDIANTE EXTRACCIÓN POR PUNTO NUBE.	
III.1.- INTRODUCCIÓN	92
III.1.1.- EL PUNTO NUBE	92
III.1.2.- EXTRACCIÓN DE SOLUTOS MEDIANTE LA METODOLOGÍA DE PUNTO NUBE	99
III.1.2.1.- <i>Bases experimentales para la separación de fases</i>	99
III.1.2.2.- <i>Aplicación de la metodología de punto nube a la extracción y preconcentración de los HAPs</i>	101
III.1.3.- OBJETO DEL TRABAJO	106
III.2.- PARTE EXPERIMENTAL	108
III.2.1.- REACTIVOS	108
III.2.1.1.- <i>Agua de mar artificial</i>	108
III.2.2.- EQUIPOS	109
III.2.2.1.- <i>Sistemas de extracción</i>	109
III.2.2.2.- <i>Control de la temperatura</i>	109
III.2.2.3.- <i>Cromatografía líquida de alta resolución</i>	109
III.2.2.4.- <i>Cromatografía de gases con detección por</i>	

	<i>espectrometría de masas</i>	109
III.2.3.-	METODOLOGÍAS	110
III.2.3.1.-	<i>Estudios relacionados con la formación del punto nube</i> ...	110
	- <i>Determinación de la temperatura de punto nube y</i> <i>diagrama de fases</i>	110
	- <i>Determinación de la relación de volúmenes</i>	110
	- <i>Preconcentración de HAPs por punto nube</i>	111
III.2.3.2.-	<i>Determinación de HAPs presentes en sedimentos marinos</i> ..	111
	- <i>Contaminación del sedimento</i>	111
	- <i>Extracción asistida por ultrasonidos y preconcentración</i> <i>de HAPs</i>	111
	- <i>Extracción asistida por microondas y preconcentración</i> <i>de HAPs</i>	111
	- <i>Análisis cromatográfico</i>	112
III.2.3.3.-	<i>Determinación de HAPs presentes en agua de mar</i>	112
	- <i>Contaminación del agua de mar</i>	112
	- <i>Extracción y preconcentración de HAPs</i>	112
	- <i>Análisis cromatográfico</i>	113
	- <i>Validación de la metodología mediante extracción</i> <i>líquido- líquido convencional (ELL) y cromatografía de</i> <i>gases con espectrometría de masas (CG-MS)</i>	113
III.3.-	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	115
III.3.1.-	CARACTERIZACIÓN DEL PUNTO NUBE DEL POLE	115
III.3.1.1.-	<i>Diagrama de fases</i>	115
III.3.1.2.-	<i>Optimización del proceso de separación de fases</i> <i>en la metodología de extracción por punto nube</i>	116
	- <i>Influencia de la concentración y volumen del surfactante.</i>	120
	- <i>Influencia de la temperatura y tiempo de equilibrio</i>	121
	- <i>Influencia de la fuerza iónica del medio</i>	123
	- <i>Influencia de la presencia de modificadores orgánicos</i> ..	124

III.3.2.- PRECONCENTRACIÓN DE HAPs EXTRAÍDOS DE SEDIMENTOS MARINOS	128
III.3.2.1.- <i>Determinación de HAPs. Características analíticas del método</i>	128
III.3.2.2.- <i>Determinación de HAPs contenidos en sedimentos marinos. Aplicación de la metodología de punto nube</i>	133
III.3.3.- EXTRACCIÓN DE HAPs DE AGUA DE MAR	136
III.3.3.1.- <i>El punto nube en matrices de agua de mar</i>	136
- <i>Temperatura crítica y diagrama de fases</i>	137
- <i>Factor de preconcentración</i>	138
III.3.3.2.- <i>Análisis cromatográfico</i>	139
III.3.3.3.- <i>Efecto de la concentración de analito</i>	146
III.3.3.4.- <i>Determinación de HAPs en agua de mar</i>	147
III.3.3.5.- <i>Efecto del POLE en la estabilidad de los HAPs durante el almacenamiento de muestras</i>	152

CAPÍTULO IV: LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y LA DETERMINACIÓN DE HAPs.

IV.1.- INTRODUCCIÓN	158
IV.1.1.- PARÁMETROS QUE AFECTAN AL PROCESO DE EXTRACCIÓN ..	159
IV.1.1.1.- <i>Recubrimientos</i>	160
IV.1.1.2.- <i>Tiempo y Temperatura del proceso de extracción</i>	162
IV.1.1.3.- <i>Adición de sales y disolventes orgánicos</i>	163
IV.1.1.4.- <i>Volumen de muestra</i>	163
IV.1.1.5.- <i>Efecto matriz</i>	164
IV.1.1.6.- <i>Derivatización</i>	164
IV.1.2.- EL PROCESO DE DESORCIÓN	165
IV.1.3.- APLICACIÓN DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA AL ANÁLISIS DE MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES	165

IV.1.3.1.-	<i>Muestras gaseosas</i>	166
IV.1.3.2.-	<i>Muestras líquidas</i>	166
IV.1.3.3.-	<i>Muestras sólidas</i>	167
IV.1.4.-	OBJETO DEL TRABAJO	169
IV.2.-	PARTE EXPERIMENTAL	171
IV.2.1.-	REACTIVOS Y MATERIALES	171
IV.2.2.-	EQUIPOS	171
IV.2.3.-	METODOLOGÍAS	172
IV.2.3.1.-	<i>Métodos cromatográficos de análisis</i>	172
IV.2.3.2.-	<i>Procedimiento de microextracción en fase sólida</i>	172
IV.2.3.3.-	<i>Procedimiento de microextracción de HAPs en sedimentos marinos</i>	175
IV.3.-	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	176
IV.3.1.-	MICROEXTRACCIÓN DE HAPs EN MEDIOS ACUOSOS	176
IV.3.1.1.-	<i>Perfiles de tiempos de extracción</i>	178
IV.3.1.2.-	<i>Linealidad, precisión y límites de detección</i>	185
	- <i>Rango de linealidad</i>	185
	- <i>Precisión</i>	185
	- <i>Límites de detección</i>	186
IV.3.2.-	INFLUENCIA DE LOS MEDIOS MICELARES EN LA SEPARACIÓN DE HAPs POR SPME	191
IV.3.3.-	MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE CONSTANTES DE INTERACCIÓN SOLUTO-MICELA	201
IV.3.4.-	MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA MICELAR- CROMATOGRAFÍA DE GASES-MASAS PARA LA DETERMINACIÓN DE HAPs	209
IV.3.4.1.-	<i>Determinación de HAPs presentes en un medio micelar</i>	

	<i>de POLE, después de su extracción por SPME</i>	210
IV.3.4.2.-	<i>Determinación de HAPs contenidos en sedimentos marinos mediante microextracción en fase sólida micelar y CG-MS.</i>	216
CONCLUSIONES	222
BIBLIOGRAFÍA	230

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I

I.- INTRODUCCIÓN

En la presente Tesis se aborda el desarrollo de metodologías relacionadas con el tratamiento de las muestras, antes de proceder a la etapa de medida, que permitan la extracción y preconcentración de analitos con el empleo de medios micelares.

Los analitos objetivo de este estudio son el grupo de dieciséis hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), priorizados por la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) por su interés medioambiental, en atención al impacto que pueden originar en el medio marino vertidos de diferente naturaleza, que contienen cantidades variables de HAPs. Las metodologías a desarrollar se aplicaron a muestras de sedimentos y de agua de mar, principales receptores de estos contaminantes al introducirse en el medio marino.

A continuación se incluyen algunas consideraciones generales, relacionadas con las principales características de los HAPs, con especial referencia a su presencia en el medio marino, y de los sistemas micelares, haciendo hincapié en su poder solubilizante para analitos de diferente naturaleza. En capítulos posteriores se comentarán los fundamentos y características de las metodologías y técnicas a emplear, en conjunción con los medios micelares, para alcanzar los objetivos propuestos.

I.1.- HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS. CARACTERÍSTICAS E INTERÉS MEDIOAMBIENTAL

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) son compuestos que contienen carbono e hidrógeno en estructuras aromáticas. Sólo algunos de ellos, como el antraceno y el pireno, se producen industrialmente, pero se encuentran de forma natural en numerosos materiales orgánicos fósiles y pueden originarse, además, cuando se produce la combustión incompleta, a temperaturas elevadas, de materiales orgánicos que contengan carbono, así como de combustibles fósiles. Si estos materiales contienen también oxígeno, azufre y nitrógeno

pueden originarse hidrocarburos heteroaromáticos [1].

Existen diversas formas de clasificar a los HAPs. Entre ellas, es particularmente útil la que hace uso del principio de alternancia. Esta clasificación divide a los HAPs en sistemas alternantes y no alternantes. Los HAPs alternantes en estado fundamental y que posean un número par de átomos de carbono, tienen estructuras cerradas, es decir, todos los orbitales π enlazantes están ocupados por dos electrones con spin apareado y todos los orbitales antienlazantes están vacíos.

Las propiedades de los HAPs dependen en gran medida del tamaño, relacionado con el número de electrones π o de orbitales moleculares enlazantes ocupados, y de la topología o tipo de unión entre los anillos [2].

Además de los anillos de seis eslabones, los HAPs pueden presentar anillos de cinco eslabones. A estos hidrocarburos se les conocen como HAPs no alternantes. La principal diferencia topológica radica en que, en estos compuestos, los orbitales moleculares enlazantes y no enlazantes están distribuidos asimétricamente con respecto al punto de referencia de energía. Otra diferencia importante es que en los HAPs alternantes, la distribución de carga es uniforme sobre todos los centros, mientras que los no alternantes presentan frecuentemente un cierto momento dipolar.

Otra forma de clasificar los HAPs, de acuerdo con su estructura, es la división en sistemas cata-anillados y sistemas pericondensados. En los primeros, los carbonos terciarios se encuentran en el centro de dos anillos aromáticos, mientras que en los sistemas pericondensados alguno de los carbonos terciarios se encuentran en el centro de tres anillos aromáticos.

















La solubilidad de estos compuestos es un parámetro que determinará en gran manera la concentración y el tipo de HAPs que podemos encontrar en el medio ambiente acuoso. Aunque la solubilidad de los HAPs en agua es muy baja, por ejemplo $2.6 \cdot 10^{-4}$ mg/L para el dibenzo(a,h)antraceno, o $5 \cdot 10^{-4}$ mg/L para el benzo(a)pireno, estos compuestos pueden aumentar su solubilidad en presencia de detergentes, sales alcalinas, ácidos grasos o disolventes orgánicos [3]. También tiene una influencia considerable en la solubilidad de estas sustancias, la presencia de grupos alquílicos en sus moléculas, así como la configuración geométrica de las mismas. Otro factor importante a tener en cuenta es la temperatura, pudiéndose triplicar la solubilidad de

algunos HAPs al variar la temperatura entre 6 y 26 °C. Por otra parte, los HAPs son capaces de asociarse con los coloides presentes en el medio y, de esta forma, pueden ser transportados a través del mismo. De esta forma, se justifica la presencia de HAPs en organismos que habitan en lugares alejados de una intensa actividad humana o el hecho de que los sedimentos sean más ricos en HAPs que el medio que los rodea [4].

La Agencia Federal para la Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos ha seleccionado 16 HAPs como contaminantes cuyo estudio debe considerarse prioritario. En la Tabla I.1 se recogen dichos hidrocarburos, junto con sus estructuras, constantes fisicoquímicas y potencia cancerígena estimada. Entre ellos, destacan por sus características cancerígenas el Benzo(a)pireno, Dibenzo(a,h)antraceno, Indeno(1,2,3-cd)pireno, Benzo(a)antraceno, Benzo(k)fluoranteno, Criseno y Benzo(ghi)perileno.

El papel de los HAPs como inductores del conjunto de anomalías celulares conocidas como "cáncer", ha atraído el interés y la actividad de los investigadores, habiéndose estudiado cómo la estructura de los HAPs es crítica para las propiedades cancerígenas y teratogénicas de los mismos. La introducción de un grupo alquilo en la molécula de los HAPs parece, también, jugar un papel esencial en su actividad cancerígena, ya que tal sustitución puede dar lugar a una alteración de la distribución electrónica de la molécula, pudiendo originar un efecto activador o desactivador. Los HAPs no son, aparentemente, cancerígenos reales en sí mismos, pero son metabólicamente convertidos en cancerígenos activos en el interior del organismo receptor. Dado que muchos compuestos orgánicos cancerígenos son electrofílicos, una teoría ampliamente apoyada es que estas sustancias reaccionan con un átomo de nitrógeno del ADN, modificando el mensaje genético transmitido durante la formación de nuevas células [5-9].

Tabla I.1.- Los 16 HAPs seleccionados por la Agencia Federal para la Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos.

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

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

-: no experimentado en humanos

^aIARC: Agencia Internacional en la Investigación del Cáncer.

I.1.1.- LOS HAPs EN EL MEDIO MARINO

La presencia de HAPs en el medio ambiente marino es el resultado de las aportaciones de diferentes fuentes, entre las que destacan las antropogénicas [10,11]. Al ecosistema marino los hidrocarburos aromáticos pueden llegar por vertidos directos, mediante lixiviado de suelos circundantes, deposición atmosférica seca y, sobre todo, húmeda, es decir, arrastrados por el agua de lluvia, y por biosíntesis. De forma general, los HAPs son relativamente poco solubles en agua, pero su solubilidad varía mucho de unos compuestos a otros. Como se ha comentado con anterioridad, diversos factores relacionados con la estructura de los HAPs y con características del medio, también pueden modificar dicha solubilidad.

En la columna de agua, los HAPs tienden a adsorberse sobre las partículas en suspensión para ser posteriormente depositados y entrar a formar parte de los sedimentos [12]. En los sedimentos, la degradación generalmente es lenta, particularmente las de los HAPs de mayor peso molecular [5,6,13-15].

Estos fenómenos han sido puestos de manifiesto por los estudios realizados en agua, biota y sedimentos, en los que se ha demostrado que estos últimos son más ricos en HAPs. El hecho de que haya podido demostrarse [16-18] que el perileno puede ser sintetizado en los sedimentos, a partir de los pigmentos de las plantas, bajo condiciones anaerobias reductoras, no disminuye la importancia de dicho compuesto como contaminante antropogénico, al ser uno de los HAPs que se produce en mayor extensión durante la combustión de combustibles fósiles y por su presencia en el petróleo crudo y sus derivados.

Los HAPs pueden ser acumulados por los organismos acuáticos, entrando a formar parte de los procesos biológicos que en ellos tienen lugar, afectando a niveles letales y sub-letales su fisiología. Su presencia no solo afectará a los individuos como tales, sino también, como integrantes de una cadena alimenticia, al equilibrio ecológico establecido en el mar. Los HAPs son metabolizados por los peces, y, en menor o nula medida, por moluscos y crustáceos, dando lugar a metabolitos polares que pueden ser excretados con relativa facilidad.

I.1.2.- CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN EN AGUAS Y SEDIMENTOS MARINOS

La consideración de la contaminación acuática como un trabajo de la máxima importancia social, ha sido impulsada por un conjunto de acontecimientos en los que la salud humana se ha visto implicada. En general, la protección del medio ambiente "per se", ha sido un factor menos relevante. En cualquier caso, en años recientes, la protección del medio ambiente acuático ha ido considerándose, cada vez con mayor intensidad, de mayor prioridad.

Por su situación geográfica y por la presión urbanística, la franja costera en el archipiélago canario se encuentra bajo la presión de numerosas actividades con potencial incidencia en los ecosistemas marinos: vertidos de aguas residuales urbanas e industriales sin depurar o, en el mejor de los casos, después de un tratamiento primario; vertido de residuos y escombros; acumulación de residuos de combustibles y derivados del petróleo, procedentes de derrames accidentales o de operaciones de limpieza de tanques de buques petroleros y otros, etc. En la actualidad, estos últimos deben considerarse una de las principales fuentes de contaminación por hidrocarburos y, en particular, por HAPs, constituyendo una de las principales amenazas de los ecosistemas costeros. La necesidad de disponer de metodologías analíticas que aporten información rápida y fiable sobre la presencia de contaminantes del medio marino es evidente.

Varios problemas importantes existen con los métodos tradicionales de control de contaminantes en las aguas naturales [19]. Entre ellos, los más importantes están relacionados con las bajas concentraciones en que pueden encontrarse los contaminantes, con la consiguiente limitación para ser detectados y cuantificados, además de la significación que pueden alcanzar los errores inadvertidos que se introduzcan en los procedimientos de muestreo y análisis.

Los análisis de contaminantes en muestras de aguas naturales pueden resultar muy útiles para detectar problemas asociados a vertidos puntuales. Su mayor desventaja estriba en las pequeñas correlaciones que suelen existir entre las concentraciones de contaminantes presentes y su disponibilidad biológica [20, 21].

Entre los potenciales contaminantes del medio marino, existen notables diferencias en

sus solubilidades en medios acuosos y, en consecuencia, entre los equilibrios de distribución entre la disolución y la materia en suspensión. Este comportamiento justifica el secuestro preferencial en sedimentos de muchos contaminantes de interés, por lo que los sedimentos suelen entrar en el diseño de programas de control, especialmente para definir la localización de fuentes de contaminación, establecer los incrementos producidos en las concentraciones halladas en las proximidades de fuentes, establecimiento de la evolución de procesos contaminantes acumulativos, etc. No obstante, la interpretación de los resultados relacionados con la presencia de contaminantes en sedimentos, debe realizarse con cautela, por la influencia de los flujos relativos de contaminantes y de partículas en suspensión, velocidad de sedimentación de las partículas, granulometría y contenido en carbono orgánico del sedimento, etc.

En cualquier caso, los sedimentos pueden resultar de gran utilidad en el control regular de la contaminación en medios ambientes acuáticos. Es conocido que los sedimentos actúan como sumideros intermedios y finales para muchos contaminantes, y que, además, se producen removilizaciones, especialmente de sustancias orgánicas, y parte de los contaminantes pueden pasar a la porción biótica del ecosistema [22,23]. Desgraciadamente, no es posible la identificación segura de la porción biodisponible de cualquier contaminante en sedimentos, usando solamente métodos químicos de análisis.

En muchos casos, las concentraciones de contaminantes en sedimentos son varios órdenes de magnitud mayores que las existentes en el medio acuático, con lo cual se evitan algunos de los problemas comentados en el análisis de las muestras de agua, aunque pueden aparecer otros asociados al tratamiento de las muestras.

I.2.- SISTEMAS MICELARES

I.2.1.- CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los surfactantes son moléculas anfifílicas que poseen un grupo polar unido a otro no polar en forma de cola, que constituyen las regiones hidrofílica e hidrofóbica, respectivamente.

La parte hidrofóbica está constituida por una cadena hidrocarbonada, con un número de átomos de carbono generalmente comprendido entre ocho y dieciocho. La parte hidrofílica, o cabeza polar, puede ser iónica o no iónica, lo que permite clasificar los surfactantes en cuatro grupos: aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos y no iónicos.

La naturaleza anfifílica de los surfactantes confiere a estas moléculas propiedades únicas, entre las que destacan:

- La actividad asociada a las interfases, debida a procesos de adsorción y formación de monocapas, fenómeno responsable de la mayor parte de las aplicaciones industriales de los surfactantes: detergentes, mojantes, estabilizadores de emulsiones o microemulsiones, etc.
- La formación de micelas.

En agua, a baja concentración, los surfactantes existen como monómeros, pero cuando su concentración excede un cierto valor, llamado concentración micelar crítica (cmc), se produce su asociación espontánea para formar agregados. El término "micela" es usado para designar una entidad de dimensiones coloidales, en equilibrio dinámico con el monómero que da lugar a su formación.

Las micelas son el resultado de la naturaleza dual de las moléculas de surfactante, la parte hidrofóbica tiende a escapar de la masa de agua y la parte hidrofílica interacciona fuertemente con ella. El agua tiene una estructura cerrada, debido a los enlaces hidrógeno tridimensionales, que permite la existencia de clústers de moléculas de agua conteniendo cavidades de tamaño específico, que pueden acomodar cadenas no polares [24,25]. Para un surfactante dado y a una temperatura dada, sólo una cierta cantidad de monómeros pueden acomodarse en tales cavidades, y una adición posterior de surfactante daría lugar a la formación de micelas.

Cada micela contiene un cierto número de moléculas de monómeros, número de agregación (N), que determina su forma y tamaño. El tamaño exacto y la forma de las micelas es aún incierto, habiéndose propuesto una serie de modelos que tratan de explicar las evidencias experimentales [26-36]. Se asume que una micela iónica en disolución acuosa, es más o menos esférica. Los grupos hidrofílicos están dirigidos a la fase acuosa (Capa de Stern), mientras que

las cadenas hidrocarbonadas se orientan fuera del agua, formando el core hidrofóbico central. La región adyacente a la capa de Stern contiene una alta densidad de contraiones de las cabezas polares (doble capa de Gouy-Chapman) y separa el entorno hidrofóbico del seno de la fase acuosa [37]. A escala macroscópica, un medio micelar podría ser descrito como una mezcla de disolventes orgánico y acuoso [38].

Las propiedades microscópicas de las micelas, especialmente del core central, son muy diferentes de las del disolvente circundante y las micelas pueden ser consideradas como una segunda fase. Aunque la disolución resultante es considerada como microscópicamente heterogénea, las propiedades macroscópicas del sistema total corresponden, aproximadamente, a las de una disolución verdaderamente homogénea.

El proceso de micelización se pone en evidencia porque se producen cambios en las propiedades físico-químicas de la disolución: tensión superficial, presión osmótica, conductividad, etc. La micelización corresponde a una brusca variación de estas propiedades, lo que permite la determinación del valor de la concentración micelar crítica, cuyos valores típicos se encuentran en el rango de 10^{-4} a 10^{-2} M [39-41]. Por su parte, los números de agregación varían entre 40 y 150, mientras que los radios, considerando que las micelas son esféricas, suelen oscilar entre 15 y 30 Å [42].

Es importante destacar que, en general, las micelas constituidas por surfactantes no iónicos suelen tener concentraciones micelares críticas menores y números de agregación más altos que las micelas iónicas análogas [43]. Esto se debe, en parte, a la ausencia de repulsiones electrostáticas entre las cabezas de los surfactantes no iónicos. Sin embargo, en las micelas iónicas estas repulsiones tienden a limitar el número de agregación y la cmc.

Las características de las micelas se modifican tanto con las propiedades del surfactante como con las correspondientes al medio en que se encuentran. El sistema micelar puede verse afectado por cambios de presión, temperatura y fuerza iónica de la disolución [37,44,45], así como por la naturaleza y concentración de los solutos presentes en el medio micelar.

I.2.2.- PODER SOLUBILIZANTE DE LOS MEDIOS MICELARES

El poder solubilizante de las micelas es probablemente la propiedad de mayor importancia desde el punto de vista analítico. La solubilización de un analito en una micela determinada es un proceso de equilibrio dinámico y depende tanto de la naturaleza del soluto como del medio micelar empleado. En medios micelares, la cantidad de soluto solubilizado es, en general, directamente proporcional a la concentración de surfactante utilizado, una vez que la formación de las micelas ha tenido lugar. La solubilización es un fenómeno claramente micelar, una vez sobrepasada la cmc comienza la solubilización, ocurriendo en muy poca extensión a concentraciones donde los surfactantes se encuentran como agregados premicelares o monómeros.

Dependiendo del balance hidrofílico/hidrofóbico del soluto solubilizado y del sistema micelar, existen varios lugares posibles de solubilización en un sistema micelar:

- Sobre la superficie micelar, en la interfase micela-disolvente.
- Entre los grupos cabeza hidrofílicos, capa Stern.
- En la zona comprendida entre los grupos hidrofílicos y los primeros átomos de carbono de las cabezas hidrocarbonadas.
- En el “core” de la micela.

La localización de los compuestos solubilizados en la micela o su entorno depende de la polaridad de los solutos. Aunque el mecanismo real de solubilización es complejo, se puede aceptar, de una manera simple, que los sustratos iónicos con carga opuesta a los grupos cabeza de micela, pueden enlazarse fuertemente a ellos [42,44,46-49]. Las especies no polares que poseen electrones polarizables, como sucede en los compuestos aromáticos, residen cerca del grupo cabeza [50,51], mientras que los radicales alquílicos parece ser que interactúan con el “core” de la micela [50,52,53], de modo que las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas micela-soluto sean máximas. En disolventes no polares, el agua y los solutos polares se localizan en el “core” de las micelas inversas, mientras que los solutos no polares se disuelven en el disolvente no polar.

La localización de los distintos solutos en las micelas queda reflejada en la Figura I.1.

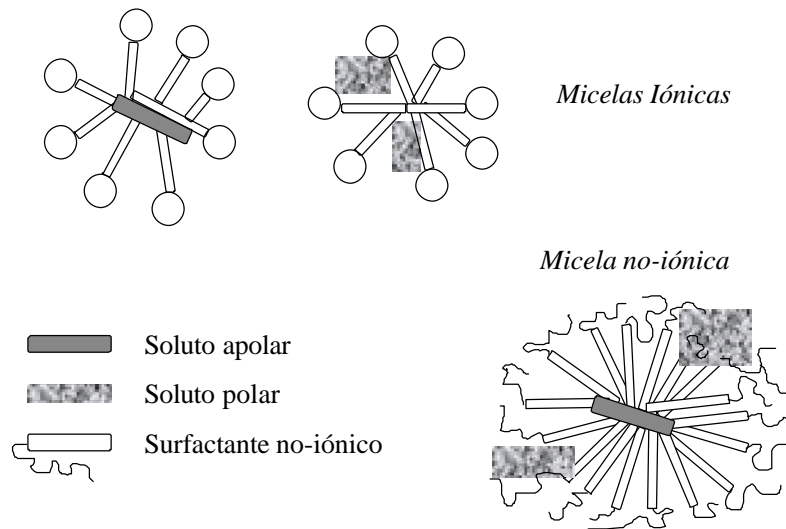


Figura I.1: Localización de solutos en las micelas. Los solutos apolares se localizan en el “core” de la micela. Los solutos polares se colocan en la capa iónica (Capa Stern).

I.2.2.1.- Coeficientes de reparto micelar

Cuando un soluto se añade a una disolución micelar, éste se distribuye entre el disolvente acuoso y las micelas. Para cuantificar esta distribución, se utiliza el coeficiente de reparto micelar o constante de distribución micelar, K_M , que se define como la relación entre la concentración de soluto en las micelas y la concentración de soluto en la fase no-micelar [54], tal y como se señala en la ecuación [I.1].

$$K_M = \frac{Nr[S]/j_m}{(1-r)[S]/(1-j_m)} \quad [I.1]$$

Donde,

N: número de agregación.

[S]: concentración de soluto en el medio micelar.

ρ : porcentaje molar de soluto en las micelas.

$(1-\rho)$: fracción de soluto localizada en la pseudo-fase acuosa.

n_m : porcentaje de volumen de la pseudo-fase micelar.

El coeficiente de reparto del soluto y su localización en las micelas están relacionados. La Figura I.2, muestra la representación de los valores de porcentaje molar de soluto en las micelas (ρ) frente a la concentración de lauril sulfato sódico (LSS), para seis solutos con valores de K_M comprendidas entre 100 y 200.000.

Para solutos con $K_M = 100$, solamente el 4% de las moléculas del soluto están localizadas en la fase micelar de una disolución 0.12 M de LSS, debido a que el volumen de fase micelar es solamente el 2.7% del volumen total. Sin embargo, el 42% y más del 99% de las moléculas de un soluto con valores de K_M de 2000 y 200000, respectivamente, están localizados en la fase micelar de una disolución 0.12 M de LSS.

Por tanto, un soluto con constante de distribución de $2 \cdot 10^5$, puede considerarse totalmente localizado en la fase micelar. Solutos con valores de K_M entre 1000 y 20000 están localizados en ambas fases, y solutos con valores de constantes más bajos estarán localizados principalmente en la pseudo-fase acuosa.

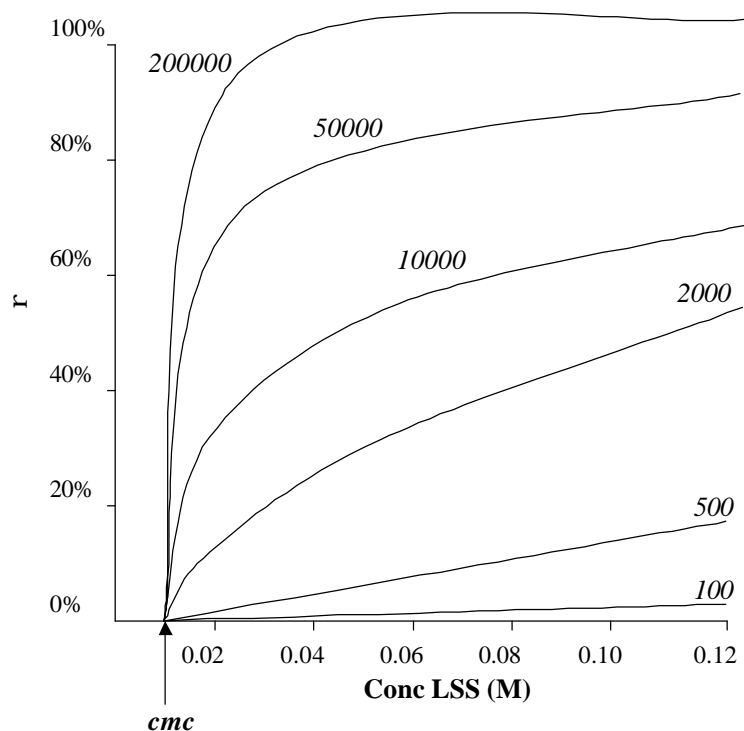


Figura I.2: Variación del porcentaje de moles de soluto en las micelas, como una función de la concentración de LSS y de la constante de reparto soluto-micela. Tomado de la referencia [55].

I.2.3.- INTERÉS EN QUÍMICA ANALÍTICA

La adición de agentes tensioactivos (surfactantes) a los medios de reacción proporciona numerosas ventajas de tipo cinético, acelerando las reacciones por efecto de la concentración local que se produce en la micela, favoreciendo unos procesos frente a otros, con el consiguiente aumento de la selectividad. Además, estos sistemas proporcionan ventajas específicas en función de los métodos de medida.

En Química Analítica son ya numerosas las aplicaciones que se han encontrado a los medios micelares, destacando su utilización en conjunción con Métodos Electroquímicos,

Espectroscópicos y de Separación. En este trabajo se hará hincapié en estos últimos.

En los métodos de separación, los sistemas micelares se han utilizado especialmente en procesos de extracción, cromatográficos y electroforéticos.

1.2.3.1.- Procesos de extracción

Las micelas poseen la capacidad de solubilizar diferentes compuestos, lo que permite extraer los substratos o complejos insolubles del medio acuoso, en una fase de menor volumen que está formada casi enteramente por surfactante.

Existe una gran variedad de posibles esquemas para la extracción mediante surfactantes, dependiendo de la naturaleza de los analitos y del surfactante utilizado, que podemos clasificar en dos grandes grupos: utilización de surfactantes en disolventes orgánicos, es decir, empleo de micelas inversas para la extracción de enzimas extracelulares [56], proteínas [57], metales [58,59], etc.; y aquellos que utilizan disoluciones acuosas. En este último grupo podemos trabajar mediante la utilización de micelas normales, como por ejemplo, para el aislamiento y purificación de compuestos bioquímicos y componentes de membrana [60,61], y la extracción por separación de fases (metodología por “punto nube” [62-64] y separación por coacervados [57]).

1.2.3.2.- Separaciones cromatográficas

La presencia de surfactantes, en concentraciones superiores a su cmc, en la fase móvil, ha generado un nuevo tipo de cromatografía denominada Cromatografía Líquida Micelar [65-70]. La capacidad que poseen los sistemas micelares para interactuar con gran cantidad de sustancias, tanto hidrofóbicas como iónicas, ofrece grandes posibilidades en la separación de analitos por cromatografía líquida de alta eficacia. Las separaciones se consiguen por distribución de los solutos entre las fases estacionaria, acuosa y micelar.

I.2.3.3.- Métodos electroforéticos

La Electroforesis Capilar (EC) se puede utilizar con fases micelares. El primer uso de tales fases con EC se debe a Terabe, quien, en 1984, denominó a esta técnica Cromatografía Micelar Electrocinética (MEKC) [71]. El éxito de esta técnica supuso extender la aplicación de la EC a moléculas y todo tipo de especies sin carga. De hecho, la EC se convirtió en una herramienta esencial en el campo de la separación de especies biológicas. [72-75].

En MEKC las micelas poseen un tiempo de retención que depende directamente de la carga y tamaño de la micela. El factor de retención, en cambio, no es proporcional al tiempo de retención. Cuando la afinidad del soluto por la micela es elevada, el factor de retención es muy alto, y el tiempo de retención es próximo al tiempo de retención de la micela. Las capacidades de separación por MEKC son mayores con micelas aniónicas que con micelas catiónicas [76].

La MEKC combina altas eficacias, versatilidad, rapidez, sencillez en el uso y selectividad ajustable a las conveniencias.

I.2.3.4.- Otras aplicaciones

Los surfactantes también pueden aplicarse en metodologías de separación por ultrafiltración [77,78] y en membranas líquidas de surfactantes [79]. La utilización de surfactantes en la separación por ultrafiltración, se basa en la asociación de los solutos con las micelas y la separación posterior de las mismas haciendo pasar la disolución a través de una membrana de ultrafiltración. Esta membrana, debe tener un tamaño de poro lo suficientemente pequeño para bloquear los agregados micelares y, por otra parte, debe ser lo suficientemente grande como para permitir un flujo aceptable. Normalmente esta técnica se aplica para la determinación de iones metálicos, mediante la utilización de ligandos hidrofóbicos que han sido incorporados en las micelas. Debido a esto, es una técnica que puede llegar a tener muchas aplicaciones industriales.

En cuanto a la utilización de los medios micelares como membranas líquidas, comenzó a aplicarse hacia 1960, y desde entonces se ha convertido en una técnica muy popular para aislar y purificar una gran variedad de analitos. En esta técnica, el surfactante actúa como vehículo de

transporte, pudiendo aparecer en forma de monómeros, actuando como par iónico o agente de transferencia entre las fases. Así, podemos utilizarla para la separación de hidrocarburos, recuperación de aminas, fenoles y ácidos orgánicos presentes en aguas residuales, y en la separación y recuperación de iones metálicos. Actualmente, se está aplicando la membrana líquida de surfactantes en el aislamiento y purificación de proteínas y enzimas.

I.3.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En los últimos años se han desarrollado numerosos métodos de análisis que permiten la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de interés medioambiental, con elevada sensibilidad. Sin embargo, la complejidad de las muestras, la necesidad de recuperaciones eficaces y cuantitativas, así como la presencia de diversas especies que actúan como interferentes, obliga a realizar tratamientos de las muestras que suponen aportaciones importantes al tiempo de análisis, así como la introducción de disolventes orgánicos que presentan una toxicidad considerable y que pueden provocar impactos importantes para el medio ambiente.

En la presente Tesis se ha planteado, como objetivo central, el desarrollo de procesos eficaces de extracción y/o preconcentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos, presentes en muestras de agua de mar y sedimentos marinos que, en relación a los métodos de extracción convencionales, supongan tratamientos:

- Menos energéticos
- Más rápidos
- Que utilicen reactivos menos contaminantes y/o tóxicos.

Como se ha comentado en la introducción, los medios micelares han sido ampliamente utilizados en numerosas facetas propias de la Química Analítica, y entre ellas, en el campo de los métodos de separación. Como es sabido, la solubilización de un amplio número de contaminantes

orgánicos, incluidos muchos de naturaleza hidrofóbica, aumenta drásticamente en presencia de medios micelares. Estos sistemas microheterogéneos pueden solubilizar y compartimentalizar solutos iónicos y neutros en diferentes regiones de la estructura del agregado, alterando de forma considerable los equilibrios químicos y la reactividad de los sustratos enlazados.

En atención a lo expuesto, y con objeto de lograr la solubilización de HAPs contenidos en muestras de sedimentos marinos, puede resultar útil aprovechar las características favorables que pueden aportar los medios micelares, en combinación con técnicas que utilizan radiación de ultrasonidos o de microondas. De esta forma, dentro del objetivo central planteado, definiríamos el siguiente objetivo parcial:

La extracción, asistida por microondas o por ultrasonidos, de hidrocarburos aromáticos policíclicos, utilizando medios micelares como extractantes.

Entre otras ventajas, pretendemos conseguir, con respecto a los métodos convencionales, una reducción considerable en el tiempo empleado en el tratamiento de las muestras, introducir nuevos extractantes, con mejores características en cuanto a costos, toxicidad e incidencia medioambiental, así como disponer de los HAPs solubilizados en un medio compatible con el análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

En otro orden de cosas, las concentraciones de muchos analitos en muestras de interés medioambiental, como sucede con los HAPs presentes en agua de mar, pueden requerir la necesidad de introducir una etapa de preconcentración, que permita alcanzar los límites de detección necesarios.

El uso de sistemas micelares, como alternativa a otras técnicas de separación, presenta algunas características importantes, como puede ser la elevada capacidad de concentrar analitos de diferente naturaleza, con altas recuperaciones y elevados factores de preconcentración que, por otra parte, pueden modificarse fácilmente. Esto permite diseñar estrategias para alcanzar determinados factores de preconcentración, como una función de la cantidad de analito, el volumen disponible de muestra y la técnica analítica a emplear.

En base a lo expuesto, otro objetivo parcial a alcanzar en el presente trabajo, sería:

La extracción y/o preconcentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos, utilizando técnicas de extracción por separación de fases en medios micelares.

La metodología a desarrollar dentro de este objetivo sería utilizable en la preconcentración de HAPs contenidos en muestras de agua de mar, o presentes en muestras procedentes de la solubilización, asistida por microondas o ultrasonidos, de sedimentos marinos.

Además de las ventajas expuestas al referirnos a la utilización de los medios micelares en la solubilización de los HAPs, se pretende conseguir aumentos de sensibilidad, que permitan alcanzar la cuantificación de los HAPs contenidos en el medio marino, a concentraciones del orden de ppb (ng/mL).

Por último, una técnica de considerable auge en los últimos tiempos, y que ha supuesto un avance considerable en la inyección de analitos en sistemas cromatográficos, es la microextracción en fase sólida (SPME). Sin embargo, las metodologías descritas no se encuentran suficientemente desarrolladas y, además, suelen limitarse a solutos contenidos en medios acuosos.

La extracción de HAPs con la utilización de medios micelares, de acuerdo con los objetivos planteados con anterioridad, permite disponer de los analitos en un medio compatible con el empleo de la extracción con microfibras. De esta forma, podríamos extender el campo de la aplicación de la microextracción en fase sólida a solutos presentes en muestras sólidas, como son los sedimentos marinos. Además, aparte de la utilización de la cromatografía líquida de alta eficacia como método analítico, cuando los HAPs se encuentran en un medio micelar, se podría emplear la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas, con el potencial que puede aportar desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo.

De acuerdo con lo expuesto, el tercer objetivo parcial a alcanzar, dentro del planteamiento global realizado, sería:

La determinación de HAPs mediante extracción micelar-microextracción en fase sólida y cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas.

CAPÍTULO II

EXTRACCIÓN MICELAR DE HAPs, CONTENIDOS EN SEDIMENTOS MARINOS, ASISTIDA POR MICROONDAS O ULTRASONIDOS.

II.1.- INTRODUCCIÓN

II.1.1.- EXTRACCIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS DE MUESTRAS SÓLIDAS

La extracción de compuestos orgánicos contenidos en matrices sólidas medioambientales (HAPs, PCBs y pesticidas, fundamentalmente) se ha realizado, frecuentemente, haciendo uso de disolventes orgánicos, con o sin calentamiento adicional. Este proceso está ampliamente representado en técnicas como la extracción Soxhlet o la extracción líquida convencional.

La extracción Soxhlet normalmente requiere de grandes volúmenes (superiores a 150 mL) de, en general, disolventes orgánicos clorados. Además, el reflujo con tales disolventes y la muestra sólida debe realizarse a lo largo de 6 a 24 horas. Aunque se pueden realizar diferentes experiencias, de forma simultánea, este proceso implica un trabajo tedioso y largo en el tiempo.

La extracción líquida convencional, por otra parte, requiere de un menor uso de material de vidrio, menores volúmenes de disolventes orgánicos y es relativamente rápida (de 10 a 30 minutos, en general). Sin embargo, no suele conducir a extracciones cuantitativas.

Estos problemas han llevado al desarrollo de nuevas técnicas de extracción, entre las que destacan las incluidas a continuación: extracción con fluidos supercríticos, extracción asistida por microondas o ultrasonidos y extracción acelerada con disolventes.

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) apareció hace ya veinte años. Esta técnica se basa en las propiedades similares a los gases y a los líquidos que presentan los fluidos supercríticos, en general CO_2 , para extraer analitos orgánicos de matrices sólidas medioambientales a $T > 31.1\text{ }^\circ\text{C}$ y presiones de 74.8 atm (1070.4 psi). Las limitaciones iniciales de esta técnica residían en su incapacidad de extraer moléculas polares, que frecuentemente se encuentran en matrices reales. Combinando el dióxido de carbono con modificadores orgánicos, como puede ser el metanol, se pueden extraer un número importante de moléculas, dentro de un amplio rango de polaridad, con lo cual la limitación antes mencionada queda superada.

Otra técnica instrumental a destacar es la extracción con fluidos presurizados (PFE), disponible comercialmente como “extracción acelerada con disolventes” (ASE®). Esta técnica, que apareció comercialmente por primera vez en 1995, hace uso de disolventes orgánicos para extraer secuencialmente analitos de una muestra haciendo uso de presiones y temperaturas controladas. Con la PFE se pueden extraer hasta 24 muestras de un modo secuencial y automatizado. Un tiempo de extracción típico por muestra es de 12 minutos.

Por último, las técnicas de extracción asistida por microondas (EAM) o por ultrasonidos (EAU), a utilizar en este capítulo, se comentan en los apartados siguientes.

II.1.1.1.- Extracción asistida por microondas (EAM)

La primera aplicación que hizo uso de la radiación de microondas para la solubilización de muestras la realizó Abu-Samra en 1975 [80]. Posteriormente, el empleo de las microondas en química analítica se ha ido incrementando exponencialmente, radicando sus principales aplicaciones en la solubilización de muestras, el secado (esto es, eliminación de compuestos volátiles), etapas de clean-up, aceleración de reacciones cromogénicas, estudios de especiación y extracción asistida por microondas.

La utilización de la energía de microondas para auxiliar la extracción de compuestos orgánicos se llevó a cabo por primera vez haciendo uso de un horno de microondas doméstico a finales de la década de los 80 [81,82].

Las principales ventajas de la extracción asistida por microondas (EAM) estriban en que los tiempos de extracción giran en torno a los 30 minutos. Además, hace uso de pequeños volúmenes de disolventes orgánicos, en torno a los 50 mL [83].

En los últimos años se han extraído por EAM numerosos compuestos de las más diversas matrices, con especial énfasis en las aplicaciones medioambientales.

- Principios de la Extracción Asistida por Microondas

Consiste en el calentamiento del extractante (en general un disolvente orgánico) en contacto con la muestra, haciendo uso de la energía de microondas [84]. El reparto del analito de interés desde la muestra hasta el extractante va a depender de la temperatura y de la naturaleza del extractante.

Hay que resaltar que, al contrario de lo que sucede en un calentamiento convencional, las microondas calientan la muestra sin necesidad de calentar el vaso reactor. Así, es posible alcanzar con rapidez el punto de ebullición, disminuyendo el tiempo de extracción.

Las microondas son una radiación no-ionizante (frecuencia de 300 a 300000 MHz) que provoca movimientos moleculares por migración de iones y rotación de dipolo. La rotación dipolar hace referencia al alineamiento, debido al campo eléctrico, de las moléculas de disolvente y de la muestra, que poseen momentos dipolares permanentes o inducidos. Al caer el campo eléctrico, se vuelve a alcanzar el desorden térmico por medio de la liberación de energía térmica. A 2450 MHz, que es la frecuencia de los hornos de microondas comerciales, el alineamiento de las moléculas con el campo, seguido de su vuelta al desorden, ocurre $4.9 \cdot 10^9$ veces por segundo, lo que implica un rápido calentamiento.

Está claro que para alcanzar este calentamiento se precisa de un compuesto dieléctrico. Cuanto mayor es la constante dieléctrica, mayor es la energía térmica desprendida y, por ende, más rápido es el calentamiento. La generación de calor en una muestra depende en gran medida del factor de disipación, que es la relación entre la pérdida dieléctrica de la muestra o factor de pérdida y la constante dieléctrica. De hecho, la constante dieléctrica es una medida de la capacidad de absorber energía de microondas, mientras que el factor de pérdida sería la capacidad de disipar la energía absorbida.

En atención a lo expuesto, el efecto de la energía de microondas depende de la naturaleza del disolvente y de la muestra.

La aplicación de la energía de microondas puede llevarse a cabo por medio de dos tecnologías: con vasos cerrados (controlando presión y temperatura), o vasos abiertos (a presión atmosférica) [85,86]. La diferencia entre ambos sistemas se muestra en la Figura II.1.

- *Vasos cerrados.* El disolvente se puede calentar por encima de su temperatura de ebullición a presión atmosférica, con lo que se consigue una alta velocidad extractiva y eficacia. En estos sistemas puede existir, además, control de la temperatura. Se pueden extraer distintas muestras en distintos vasos reactores simultáneamente. Las muestras se giran en el interior de la cavidad con un carrusel rotor para asegurar la reproducibilidad, dado que el campo eléctrico no es homogéneo en la cavidad del horno.

El ejemplo de microondas comercial más utilizado es el CEM MES 1000 [87], con capacidad para 12 muestras, y los vasos poseen membrana de ruptura para evitar la existencia de sobrepresión en su interior. El control de presión y temperatura se realiza mediante un vaso adicional, sin membrana de ruptura, conectado a los correspondientes sensores.

- *Vasos abiertos.* Se trabaja a presión atmosférica. La temperatura máxima alcanzable es la temperatura de ebullición del disolvente. La energía de microondas se focaliza, por lo que el calentamiento es homogéneo y muy eficiente.

El sistema comercial más usado es el Soxwave 100 de Prolabo . La incorporación de un sistema de reflujo evita las pérdidas de los analitos volátiles.

Ambos sistemas se han comparado en la extracción de HAPs de suelos [88,89] aportando resultados similares.

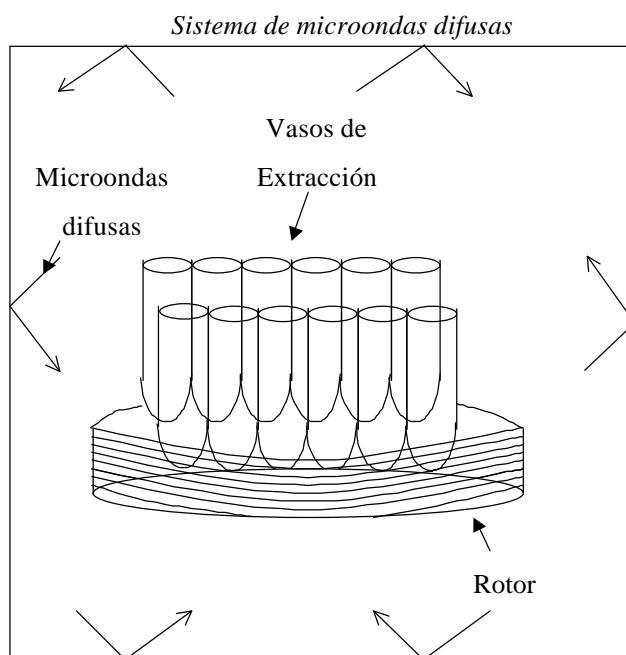


Figura II.1: Distintos tipos de sistemas de aplicación de microondas.

- Parámetros que afectan al proceso de Extracción Asistida por Microondas

Para la optimización de las condiciones de extracción, los parámetros más comúnmente estudiados son: composición y volumen del disolvente, temperatura, presión (en vasos cerrados), potencia de microondas, tiempo de extracción y características de la matriz.

- *Disolvente.* En general de naturaleza orgánica y con capacidad de absorber energía de microondas, o mezclas de disolventes para asegurar la adecuada combinación de características de solvatación y calentamiento por microondas. Es muy importante el asegurarse que toda la muestra debe estar inmersa en el disolvente orgánico para evitar daños eléctricos [90]. En todo caso, debe tenerse en cuenta las limitaciones que los sistemas de microondas que utilizan vasos cerrados imponen a la utilización de disolventes orgánicos de tipo n-alcanos, cetonas, etc.
- *Temperatura/Presión.* La temperatura es un parámetro de gran importancia. En vasos cerrados, otro factor importante es la presión, que depende directamente de la temperatura. Así por ejemplo, se obtienen altas recuperaciones de HAPs contenidos en plantas a $T > 100$ °C [91], aunque a temperaturas superiores se pierde selectividad, por lo que hay que alcanzar una situación de compromiso.
- *Potencia.* La potencia debe elegirse correctamente, tanto para evitar temperaturas excesivas que puedan producir la degradación de solutos como para que no se produzcan sobrepresiones en el interior de los vasos. Se ha estudiado su influencia en la recuperación de HAPs de suelos y sedimentos, utilizando diclorometano [92] y de PCBs de lodos [93]. En vasos cerrados, la potencia a aplicar depende del número de vasos a extraer.
- *Tiempo de extracción.* Hay que encontrar el valor óptimo. Por una parte, los altos tiempos de extracción pueden provocar la degradación de los compuestos lábiles, mientras que para tiempos pequeños, la eficacia de la extracción puede no ser adecuada.
- *Naturaleza de la matriz.* Es muy importante controlar el contenido en agua de la matriz debido al elevado momento dipolar del agua. También pueden existir interferencias por parte de los analitos presentes en la matriz, que absorban energía de microondas. Se ha encontrado que la EAM de HAPs, y otros contaminantes de suelos y sedimentos, es

altamente dependiente de la matriz, especialmente del contenido en materia orgánica, lo que conlleva una alta retención de tales compuestos. De ahí que sea más fácil la extracción en muestras contaminadas artificialmente, que en las muestras reales.

- Aplicaciones de la Extracción Asistida por Microondas

Las aplicaciones de EAM se centran fundamentalmente en la extracción de compuestos orgánicos de matrices sólidas [83,94]. Sin embargo, aunque las primeras aplicaciones estuvieron relacionadas con la determinación de HAPs y PCBs en suelos y sedimentos, otros compuestos, tales como pesticidas, fenoles y compuestos organometálicos han sido extraídos con eficacia.

En la Tabla II.1 se recogen algunas de las numerosas aplicaciones de la EAM para la determinación de HAPs en suelos y sedimentos.

Para estas matrices sólidas, la extracción de HAPs resulta satisfactoria, utilizando vasos abiertos, con diclorometano, durante 10 minutos a una potencia de 30 W [88,92,95,96]. En vasos cerrados, se han utilizado disolventes como diclorometano, acetona y mezclas acetona-hexano, destacando la acetona pura por su eficacia [89,90].

Las características de la matriz afectan profundamente a la recuperación de los HAPs, mientras que las variaciones en la temperatura, el tiempo de extracción y los volúmenes de disolvente aparentan ejercer un menor efecto en las recuperaciones de estos analitos de suelos y sedimentos. Sin embargo, existen estudios que muestran la fuerte influencia de la temperatura en la eficacia de la extracción [97].

Además de las matrices sólidas, la EAM se ha aplicado a la determinación de HAPs en muestras de agua. Dichas muestras se pasan inicialmente a través de un disco de C18, que después es sometido a extracción en vasos cerrados, empleando acetona como disolvente extractante [98].

Tabla II.1.- Aplicación de la EAM a la determinación de HAPs en muestras medioambientales.

Matriz	Equipo	Condiciones Extractivas	R (%)	Ref.
Suelo fortificado	Vasos cerrados	5 g suelo, 30 mL hexano-acetona 1:1, 115 °C, 1000 W, 10 min	47-116	[88]
Sedimento certificado (NIST 1941a)	Vasos cerrados	10 g suelo, 30 mL CH ₂ Cl ₂ , 115 °C, 1000 W, 10 min	48.5-126	[99]
Sedimentos marinos (reales y certificadas)	Vasos cerrados	5 g sedimento, 30 mL hexano-acetona 1:1, 115 °C, 500 W, 5 min	73.5-136.8	[83]
Suelos contaminados	Vasos cerrados	2 g suelo, 40 mL acetona, 120 °C, 300 W, 20 min	-	[90]
Suelo fortificado	Vasos abiertos	10 g suelo, 50 mL CH ₂ Cl ₂ , 30 W, 10 min	63.9-112	[88]
Suelos reales contaminados	Vasos abiertos	2 g suelo, 70 mL CH ₂ Cl ₂ , 297 W, 20 min	64-126 *	[89]
Suelos reales contaminados	Vasos cerrados	2 g suelo, 40 mL acetona, 120 °C, 300 W, 20 min	70.5-106 *	[89]
Suelos certificados, sedimentos y materia particulada	Vasos abiertos	1-5 g muestra, 30 mL CH ₂ Cl ₂ , 30 W, 10 min	66-109 °	[92,100]
Sedimentos marinos (SRM 1941a y muestras reales)	Vasos abiertos	0.3-10 g sedimento, 30% mezcla, 30 mL CH ₂ Cl ₂ , 30 W, 10 min	89 °	[95,96]
Suelo contaminado	Vasos abiertos	5 g suelo, 40 mL acetona-CH ₂ Cl ₂ 1:1, 30 W, 10 min	71-128 *	[101]
Suelos certificados y sedimentos	Vasos cerrados	5 g suelo, 30 mL hexano-acetona 1:1, 115 °C, 475 W, 10 min	49-150 °	[97]
Sedimentos	Horno doméstico	2-10 g sedimento, 6-30 mL tolueno, 1 mL agua, 660 W, 6 min	99-107 *	[102]
Matrices reales contaminadas (suelos con diesel) y materiales certificados	Vasos cerrados	0.1-2 g suelo, 10 mL hexano-acetona 1:1, 115 °C, 950 W, 20 min	76-132 °	[103]
Suelo certificado (ERA) y sedimento (NIST 1941 a)	Vasos cerrados	5 ó 10 g muestra, 30 mL hexano-acetona 1:1, 115 °C, 950 W, 10 min	26-114	[104]

* Respecto a la extracción Soxhlet

° Respecto a valores certificados

Las aplicaciones desarrolladas muestran que la extracción asistida por microondas se presenta como una alternativa viable a las técnicas convencionales. Como se observa en la Tabla II.2, se han descrito aplicaciones en que las eficacias de extracción conseguidas con esta técnica son comparables a las alcanzadas con otras técnicas.

Tabla II.2.- Comparación de las recuperaciones de diferentes analitos en diversas muestras empleando varias técnicas extractivas.

Analito	Muestra	SOX	EAM	SFE	ELL	Ref
Naftaleno	Sedimento marino	73.3%	80.0%	-	-	[105]
Fluoreno	Sedimento marino	73.3%	73.3%	-	-	[105]
Naftaleno	Suelo	4.2 mg/Kg	12.0 mg/Kg	10.5 mg/Kg	-	[106]
Fluoreno	Suelo	8.6 mg/Kg	13.4 mg/Kg	14.3 mg/Kg	-	[106]
Hexaconazola	Suelo "loam"	0.12 mg/Kg	0.104 mg/Kg	0.087 mg/Kg	-	[83]
Hexaconazola	Suelo arcilloso	0.14 mg/Kg	0.134 mg/Kg	0.119 mg/Kg	-	[83]
PCBs	Agua	-	90.9%	-	80.6%	[94]
Fenoles	Agua de mar	-	81.5%	-	68.7%	[107]

SOX: extracción Soxhlet; EAM: extracción asistida por microondas; SFE: extracción con fluidos supercríticos y ELL: extracción líquido-líquido convencional.

Además, con respecto a las técnicas convencionales, la EAM permite conseguir una gran reducción del tiempo de análisis y del consumo de disolventes, además de poseer la capacidad de realizar extracciones múltiples obteniendo reproducibilidades aceptables.

Por otra parte, los resultados evidencian que la EAM puede competir favorablemente con técnicas recientes, como la extracción con fluidos supercríticos (SFE) o la ASE. Particularmente,

la optimización de las condiciones experimentales a emplear en la EAM es más fácil, dado que para ella es menor el número de parámetros a controlar si se compara, por ejemplo, con la SFE. Sin embargo, la selectividad alcanzada con la EAM es menor, y generalmente requiere de un proceso adicional de clean-up antes del análisis cromatográfico.

En la Tabla II.3 se recogen las características de la extracción asistida por microondas, y las diferencias principales que presenta con respecto a otras técnicas de extracción.

II.1.1.2.- Extracción asistida por ultrasonidos (EAU)

La utilización de los ultrasonidos no llegó a aplicarse en los laboratorios químicos hasta bien entrada la década de los 70, algo que parece ilógico por lo tardío, ya que es obvio que la transmisión de las ondas del sonido a través de cualquier medio, como ondas de presión, conlleva un aumento de la movilidad de las moléculas implicadas en dicho medio.

La producción de ultrasonidos es posible gracias al descubrimiento de Marie y Pierre Curie en 1880 del efecto piezoeléctrico y su inversa. El primer aparato comercial de ultrasonidos no apareció hasta 1917. Se trataba de un sistema que, basado en la técnica eco/sonido, permitía estimar la profundidad de las aguas. Como dato anecdótico, puede señalarse que este artilugio surgió a partir de una idea aparecida en un concurso organizado en 1912, a raíz del desastre del Titanic, para encontrar un método que permitiera detectar icebergs.

Ultrasonidos es el nombre dado a cualquier onda de sonido cuya frecuencia sea superior a la frecuencia más alta que es capaz de captar el oído humano, esto es, de más de 16 kHz. Se distinguen dos áreas de ultrasonidos, la de alta frecuencia (de 1 a 10 MHz) y baja energía, y la de baja frecuencia (entre 20 y 100 kHz) y alta energía.

Los ultrasonidos ejercen su efecto a través de lo que se conoce como burbujas de cavitación. Éstas se forman en el ciclo de depresión de la onda, cuando la estructura del líquido literalmente se abre, por la presión negativa, para formar burbujas microscópicas. En el siguiente ciclo de compresión, las burbujas se ven obligadas a contraerse y, en consecuencia, implotan.

Tabla II.3.- Comparación de distintas técnicas analíticas extractivas (convencionales y recientes).

	Soxhlet	Ultrasonidos (EAU)	SFE	EAM	PFE (ó ASE)
Cantidad de muestra	10 g	2-30 g	1-10 g	2-5 g	Más de 30 g
Tiempo extracción	6, 12 ó 24 h	3 × 3 min	30 min - 1 h	20 min (y 30 min de enfriado)	12 min
Tipo de disolvente	-Acetona-hexano 1:1 -acetona-DCM 1:1 -DCM -tolueno-metanol 10:1	-Acetona-DCM 1:1 -DCM -hexano	CO ₂ (+ modificador orgánico) y C ₂ H ₂ Cl ₄ ó DCM como colectores	En general acetona-hexano 1:1 Disolventes que absorban microondas	-Acetona-hexano 1:1 -acetona-DCM 1:1 -acetona-DCM-H ₃ PO ₄ 250:125:15
Consumo de disolv.	150-300 mL	100 × 3 mL (para 30 g)	10-20 mL	25-45 mL	25 mL
Método extracción	Calentamiento	Agitación por US	Calor más presión	Calor más presión	Calor más presión
Secuencial o simultáneo	Secuencial (pero pueden haber varios)	Secuencial	Secuencial	Simultáneo (hasta 14 vasos se extraen a la vez)	Secuencial
Rapidez del método	Lento	Lento	Rápido	Rápido	Rápido
Habilidad del operador	Baja	Moderada	Alta	Moderada	Moderada
Coste del equipo	Bajo	Bajo	Alto	Moderado	Alto
Nivel automatización	Mínimo	Mínimo	De mínimo a alto	Mínimo	Completo
Método EPA	3540	3550	3560 y 3561	3546	3545
Etapas de filtración	No	Sí	No	Sí	No

Esta ruptura de las burbujas de cavitación puede generar presiones de cientos de atmósferas y temperaturas de miles de grados centígrados en micropuntos del medio, dando lugar a ondas de choque que se dispersan por el medio de reacción. Esto queda reflejado en la Ecuación II.1.

$$T_{\max} = T_o \left[\frac{P_M (k - 1)}{P} \right] \quad P_{\max} = P \left[\frac{P_M (k - 1)}{P} \right]^{\frac{k}{k-1}} \quad [\text{II.1}]$$

siendo $T_o =$ Temperatura ambiente.

$P =$ Presión en la burbuja en su tamaño máximo.

$P_M =$ Presión en el líquido en el momento de la ruptura.

$k =$ Índice politrópico (relación de calores específicos de la mezcla gas/vapor).

Los aparatos ultrasónicos comerciales más comunes en laboratorios de química son el baño de limpieza por ultrasonidos y la sonda ultrasónica. El baño presenta las ventajas de ser la fuente de irradiación económicamente más asequible, al tiempo que asegura una sencilla distribución de la energía en el reactor que se coloque en el baño. La sonda destaca por su mayor potencia, y por el hecho de que ésta sea variable.

Los efectos de la cavitación dependen del medio de reacción, por lo que cabe diferenciar entre ultrasonidos en medios homogéneos y en medios heterogéneos.

En medios homogéneos, el aumento de la reactividad química se debe a que las burbujas de cavitación normalmente no están vacías, sino que poseen algo de vapor, tanto del disolvente como de reactivos volátiles. Este vapor se ve sujeto a enormes presiones y temperaturas durante la implosión, por lo que es capaz de generar especies reactivas intermedias como radicales, carbenos, etc., con la consiguiente producción de reacciones intermoleculares. Además, la onda de choque provoca la ruptura de la estructura del disolvente, lo cual influye en la reactividad al alterarse la solvatación de las especies reactivas.

En medios heterogéneos sólido-líquido donde intervienen especies metálicas, los ultrasonidos actúan limpiando la superficie del metal y generando microperforaciones que provocan una nueva superficie a los reactivos, aumentando el área disponible para la reacción.

En medios heterogéneos sólido-líquido donde no intervienen metales, la reactividad total depende del área de reacción disponible. Los ultrasonidos pueden también producir fragmentaciones y reducción del tamaño de partícula, lo que incrementa la superficie de reacción.

En medios heterogéneos líquido-líquido los ultrasonidos generan emulsiones, aumentando el área de contacto entre líquidos y, por tanto, incrementando la región donde puede existir reacción entre sustancias disueltas en líquidos.

Son muchos los procesos químicos susceptibles de ser modificados por radiación ultrasónica. Los efectos más significativos de la aplicación de ultrasonidos son: aumentos en la velocidad de reacción, dulcificación de las condiciones experimentales y/o aumentos de rendimientos. Existen cientos de trabajos relativos a la sonoquímica en síntesis.

- Aplicaciones de la extracción asistida por ultrasonidos

La irradiación ultrasónica ya no constituye una técnica aislada sino que se ha convertido en una técnica habitual en los laboratorios, no sólo para síntesis [108-110]. De hecho, una de las mayores aplicaciones de los ultrasonidos es la extracción, tanto de compuestos orgánicos como de inorgánicos, de diversos tipos de muestras, como se observa en la Tabla II.4.

Tabla II.4.- Aplicación de los ultrasonidos como técnica extractiva para diversos compuestos en una gran variedad de matrices.

Compuesto	Matriz	Condiciones Extractivas	Ref.
		1 h, 35 °C, 10 mL acetonitrilo.	[111]
HAPs	Suelos contaminados	30 min, 100 mL hexano:acetona:tolueno (10:5:1).	[112]
HAPs	Lodos y sedimentos	20 min, CH ₂ Cl ₂ :metanol (2:1).	[113]
HAPs	Materia orgánica particulada	30 min, T ambiente, 40 mL n-hexano:acetona (1:1).	[114]
Pesticidas	Suelos	15 min, 20 mL acetona.	[115]
Tioureas	Sedimentos	3 min, 40 mL CH ₂ Cl ₂ :acetona (1:1).	[116]
Exopolímeros	Lodos activados	50 min, T ambiente.	[117]
Dibenzofuranos y dioxinas	Cenizas en aire, aerosoles	1 min, sonda ultrasónica.	[118]
Aminas aromáticas	Matrices sólidas	4.5 h, 60 mL tolueno.	[119]
Sb	Suelos	CH ₂ Cl ₂ :acetona (1:1).	[120]
Cd	Muestras biológicas	10 s, sonda ultrasónica a 40 W.	[121]
As	Pescados	10 min, T ambiente.	[122]
Hg	Pescados	10 min, 10 mL acetona.	[123]
	Tejidos de pescados	5 min, HCl.	[124]

II.1.2.- OBJETO DEL TRABAJO

La determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en muestras sólidas, y, entre ellas, los sedimentos marinos, requiere de un proceso de extracción previo que, de forma tradicional, implica la utilización de disolventes orgánicos y tiempos de extracción que pueden alargarse hasta las 10-12 horas.

Las características tóxicas y el impacto ambiental que pueden originar los disolventes orgánicos, constituyen aspectos negativos a resaltar, entre los que se presentan en los métodos habitualmente empleados para la determinación de los HAPs. Por otra parte, entre las etapas que condicionan el tiempo total de análisis de tales compuestos, quizás la más importante sea la que implica la separación de los hidrocarburos de las muestras en que se encuentran.

El objetivo principal del trabajo que se agrupa en este Capítulo consiste en intentar sustituir los disolventes orgánicos, como extractantes para HAPs presentes en sedimentos marinos, por medios micelares. Además, con objeto de acortar los tiempos de extracción se utilizan las técnicas de microondas y ultrasonidos. De esta forma, la conjunción de las propiedades solubilizantes de los surfactantes, a concentraciones superiores a su concentración micelar crítica, de los cambios en la constante dieléctrica del medio y de los efectos provocados por la acción de la radiación de microondas, en vasos cerrados, o de la radiación de ultrasonidos, deben permitir el desarrollo de métodos de análisis con características favorables respecto a los que se han venido empleando.

Para conseguir el objetivo expuesto, previamente se realiza la optimización de las variables experimentales que controlan el proceso de extracción y se establece la influencia de alguna característica controlable de la matriz, como la granulometría de la fracción de sedimento a analizar, en los métodos analíticos desarrollados.

II.2.- PARTE EXPERIMENTAL

II.2.1.- REACTIVOS

Los HAPs utilizados en los estudios incluidos en este Capítulo han sido: naftaleno (1), suministrado por Merck (Darmstad, Alemania); acenafteno (3), fluoreno (4), fenantreno (5), antraceno (6), fluoranteno (7), pireno (8), benzo(a)antraceno (9), criseno (10), benzo(b)fluoranteno (11), benzo(a)pireno (13), dibenzo(a,h)antraceno (14) y benzo(ghi)perileno (15) fueron suministrados por Aldrich-Chemie (Beerse, Bélgica); el indeno(1,2,3-cd)pireno (16) fue suministrado por Supelco (Bellefonte, PA, USA); y el benzo(k)fluoranteno (12) fue suministrado por Fluka (Buch, Suiza). Para preparar sus disoluciones se empleó como disolvente etanol, Merck (Darmstad, Alemania).

El polioxietilen-10-lauriléter (POLE) fue suministrado por Sigma (St. Louis, MO, USA). El bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) fue suministrado por Aldrich. El dodecil sulfato sódico (LSS) fue suministrado por Merck (Darmstad, Alemania).

El sulfato sódico y el cloruro de magnesio hexahidratado fueron suministrados por Panreac (Barcelona, España), el nitrato sódico y el cloruro sódico fueron suministrados por Merck, (Darmstad, Alemania).

Para el análisis por cromatografía líquida se emplearon como disolventes: acetonitrilo, calidad de gradiente HPLC (Merck, Darmstad, Alemania) y agua purificada a través de un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Agua de la misma calidad se utilizó para preparar las disoluciones de sales y surfactantes.

II.2.2.- EQUIPOS

El equipo de extracción por microondas consiste en un sistema de digestión por microondas CEM MDS 2000 (Matthews, NC, USA) que opera a unos 630 W (100%) de energía de microondas, con una frecuencia de 2450 MHz a potencia total. Las condiciones de extracción pueden ser controladas mediante un seguimiento constante de los valores de presión en el interior del vaso de control. Además, el sistema posee conexión a una impresora, así como capacidad de memoria para los datos experimentales y los métodos de trabajo. Los vasos (reactores) empleados para la extracción por microondas son CEM, PFA PTFE. El cierre de los vasos incluye una membrana de ruptura, capaz de soportar temperaturas hasta 200 °C y presiones de 13.9 bares.

La extracción asistida por ultrasonidos se realizó en un baño de ultrasonidos Selecta-Ultrasons (Barcelona, España).

Las medidas de cromatografía líquida se realizaron en un equipo Waters 600, Multisolvent Delivery System (Millford, MA, USA), equipado con un inyector Waters U6K y un detector espectrofotométrico de longitud de onda variable, Waters-Lambda max 481 LC, operando a 254 nm y a una sensibilidad de 0.02. El detector de fluorescencia empleado fue el Waters 474 Scanning Fluorescence Detector, con una resolución de ± 2 nm. El software utilizado para la obtención de los cromatogramas y su posterior tratamiento fue el Autoanalysis 2.4 (SciWare, vcerda@p01.uib.es). La columna analítica empleada fue una C18 Vydac 201TP54, 5 μm , 300 Å (25cm \times 4.6mm D.I.) protegida con una guard-column C18 μ Bondapak de Waters, 10 μm , 125 Å (20mm \times 3.9mm D.I.). La jeringa utilizada para la inyección de las muestras fue una Hamilton® de 25 μL (Hamilton CO, Reno, Nevada, USA).

Para el tratamiento estadístico se hizo uso del software Statgraphics de Statistical Graphics Corporation, así como del Excel de Microsoft.

II.2.3.- MATERIALES

II.2.3.1.- *Sedimentos y proceso de enriquecimiento en HAPs*

Los sedimentos marinos que se extrajeron con el empleo de microondas fueron recolectados en la costa de Santa Cruz de La Palma (La Palma), a 8 metros de profundidad. Estos sedimentos poseen un 9.2% de materia orgánica y la siguiente distribución granulométrica: >250 μm , 82.4%; 125-250 μm , 15.1%; 74-125 μm , 0.96%; 31-74 μm , 0.25%; 15-31 μm , 0.62%; 8-15 μm , 0.00%; 4-8 μm , 0.00% y <4 μm , 0.69%.

Los sedimentos marinos que se extrajeron por ultrasonidos fueron recolectados en la costa de Granadilla (Tenerife), a 15 metros de profundidad. Estos sedimentos poseen un 5.6% de materia orgánica y la siguiente distribución granulométrica: >2000 μm , 3.50%; 1000-2000 μm , 4.75%; 500-1000 μm , 7.87%; 250-500 μm , 11.6% [$>250 \mu\text{m}$, 27.7%]; 125-250 μm , 40.5%; 63-125 μm , 20.4% [63-250 μm , 60.9%]; 31-63 μm , 0.21%; 15-31 μm , 2.14%; 8-15 μm , 2.69%; 4-8 μm , 0.75%; <4 μm , 5.65% [<63 μm , 11.4%].

Después de tamizados, se tomaron porciones de sedimentos con tamaño de grano inferior a 250 μm . La contaminación del sedimento se realizó de la siguiente manera: 0.8 g de sedimento tamizado se mezclaron con 1 mL de etanol conteniendo los HAPs a concentraciones conocidas. La adición de etanol se realiza lentamente, con agitación mecánica, hasta formar una pasta. La muestra así preparada, se guardó a continuación en la oscuridad hasta llevarla a sequedad. Las concentraciones añadidas de HAPs oscilaron entre 0.63 y 22.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ referidas a peso-seco. Los 0.8 g de sedimento quedaron contaminados por 17 μg de naftaleno, 27 μg de acenafteno, 5 μg de fluoreno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno y criseno, 2 μg de fenantreno y 7 μg de benzo(b)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno e indeno(1,2,3-cd)pireno.

II.2.3.2.- *Material de referencia certificado*

Los métodos analíticos desarrollados fueron validados con el empleo del material de referencia SRM 1941a, suministrado por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) (Gaithersburg, MD, USA). Este material de referencia es un sedimento marino bien caracterizado que se encuentra certificado para 23 HAPs individuales [125].

II.2.4.- MÉTODOS DE ANÁLISIS POR HPLC

El volumen inyectado en el cromatógrafo fue siempre de 25 μL . Para la separación y determinación de los HAPs se utilizó una mezcla acetonitrilo-agua, con un gradiente lineal de 55 a 100% de acetonitrilo durante 30 minutos, y 10 minutos más a 100% de acetonitrilo, con un flujo de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Se emplearon dos tipos de detectores: UV a 254nm, y de fluorescencia, con el programa de longitudes de onda que se muestra en la Tabla II.5.

Tabla II.5.- Programa de longitudes de onda del detector de fluorescencia, utilizado para la determinación de HAPs contenidos en sedimentos marinos.

Tiempo (min)	Longitudes de onda (nm)		Compuestos
	Excitación	Emisión	
0	222	329	1 Naftaleno
10.7	226	310	3 Acenafteno 4 Fluoreno
13.9	248	370	5 Fenantreno 6 Antraceno
17.7	275	419	7 Fluoranteno 8 Pireno
22.1	273	384	9 Benzo(a)antraceno 10 Criseno
28.5	254	451	11 Benzo(b)fluoranteno
32.2	288	406	12 Benzo(k)fluoranteno 13 Benzo(a)pireno
35.9	289	422	14 Dibenzo(a,h)antraceno 15 Benzo(ghi)perileno
40.0	297	496	16 Indeno(1,2,3-cd)pireno

II.2.5.- MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

II.2.5.1.- Asistido por ultrasonidos (EAU)

Una vez que el sedimento ha sido contaminado con cantidades conocidas de HAPs, se le añade un cierto volumen de POLE con una concentración que depende del experimento que se esté llevando a cabo. La extracción se realiza en un vaso reactor, introducido en un baño de ultrasonidos de potencia fija, durante un tiempo prefijado, que viene dictado por el diseño experimental utilizado. Una vez que dicho tiempo finaliza, se deja enfriar el vaso a temperatura ambiente. A continuación, se trasvasa cuantitativamente y se filtra a través de membranas HV Durapore de 0.45 μm , la disolución obtenida se inyecta directamente, sin tratamientos adicionales, en el sistema de HPLC. Las condiciones optimizadas para 0.8 g de sedimento fueron: 10 mL de POLE al 6.26% (p/v), y un tiempo de aplicación de ultrasonidos de 30 minutos.

En el caso del material de referencia, las condiciones optimizadas en cuanto a volumen y concentración de POLE son iguales, pero en este caso la cantidad de sedimento a emplear es de 100 mg y el tiempo total de extracción en el baño de ultrasonidos es de 210 minutos.

II.2.5.2.- Asistido por microondas (EAM)

Una vez que el sedimento ha sido contaminado con cantidades conocidas de HAPs, se le añade 10 mL de disolución acuosa de POLE (con una concentración que depende del experimento que se esté llevando a cabo). Después de colocar una membrana de ruptura en el vaso de extracción, se cierra y se introduce en la cavidad de microondas. La extracción se lleva a cabo con una presión máxima en el interior del vaso de extracción y una potencia del horno de microondas prefijadas. Ambos valores: presión y potencia, se fijan de acuerdo con el diseño experimental dependiendo del experimento particular. Una vez que el tiempo de extracción finaliza, los vasos de extracción se dejan enfriar a temperatura ambiente, antes de abrirlos. A

continuación, el sobrenadante se trasvasa cuantitativamente, se filtra a través de membranas HV Durapore de 0.45 μm , y se procede a inyectar la disolución así obtenida en el sistema de HPLC, sin necesidad de realizar ningún otro tipo de tratamiento adicional. Las condiciones optimizadas para 0.8 g de sedimento fueron: 10 mL de POLE al 1.25% (p/v), 5 minutos a una presión máxima en el interior del vaso de reacción de 2.03 bares, con 378 W (60%) de potencia del horno de microondas.

En el caso del material de referencia, las condiciones optimizadas son idénticas, pero en este caso sólo es necesario disponer de 100 mg del sedimento.

II.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.3.1.- EXTRACCIÓN MICELAR DE HAPS CONTENIDOS EN SEDIMENTOS ENRIQUECIDOS

II.3.1.1.- *Condiciones cromatográficas para el análisis de HAPs en medio micelar*

Los estudios encaminados a establecer las condiciones apropiadas para la extracción de HAPs contenidos en sedimentos marinos, así como las principales características de las metodologías establecidas, necesitan de métodos analíticos que permitan la cuantificación de los hidrocarburos en un medio micelar de POLE.

Entre las técnicas frecuentemente empleadas para la determinación de HAPs, destaca la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), utilizando detectores visible-UV o de fluorescencia. A partir de experiencias previas, se han establecido las condiciones experimentales adecuadas para la determinación por HPLC de un grupo de HAPs, presentes en disoluciones de polioxietilen-10-lauriléter (POLE) 0.10 M (6.26%, p/v), un surfactante no iónico, haciendo uso de un gradiente acetonitrilo-agua, con una fase estacionaria de octadecilsílice (C18) y un detector visible-UV de longitud de onda variable. Como quiera que los hidrocarburos se encuentran inicialmente disueltos en etanol, las disoluciones patrón de HAPs en el surfactante se han preparado manteniendo un porcentaje de alcohol fijo e igual al 0.5% (v/v).

La Figura II.2 muestra un cromatograma representativo en el que, además de poner de manifiesto que se alcanzan separaciones satisfactorias, se observa que el surfactante se retiene poco y que la señal que origina, al principio del cromatograma, no interfiere en los picos de interés analítico. Por otra parte, los estudios de reproducibilidad muestran que los tiempo de retención de los distintos HAPs, presentan desviaciones estándar relativas comprendidas entre 0.71 y 0.86%.

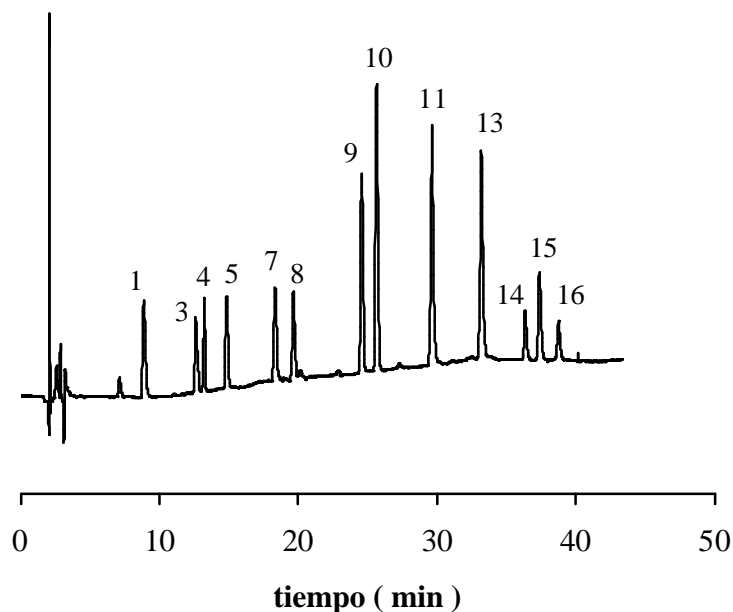


Figura II.2: Cromatograma correspondiente a una disolución de HAPs en un medio micelar de POLE 0.1 M, con detección visible-UV a 254 nm. Para la identificación de los picos, ver la Parte Experimental.

Para la cuantificación de los hidrocarburos, se construyen gráficos de calibración en los que se representan áreas de pico frente a la concentración de cada uno de los HAPs en estudio. En todos los casos, se obtuvieron relaciones lineales con valores de $R^2 > 0.990$. Los límites de detección hallados fueron calculados como tres veces la desviación estándar del blanco, y se encuentran comprendidos entre 10 y 160 ng/mL. Los parámetros de calidad del método cromatográfico se muestran en la Tabla II.6.

También se evaluó la reproducibilidad del sistema cromatográfico, encontrándose desviaciones estándar relativas que oscilaron entre 0.30 y 2.81% para los diferentes HAPs estudiados, como puede observarse en la Tabla II.7.

Tabla II.6.- Determinación de HAPs, por HPLC, en disoluciones micelares de POLE.
Parámetros de calidad del método cromatográfico.

HAP	Rango lineal (ppm)	Pendiente \pm SD	Ord. Origen \pm SD	R ²	S _{YX} *	LOD (ppb)
1 N	0.80-2.00	2.210 \pm 0.066	0.072 \pm 0.098	0.994	0.116	120
3 Ace	1.80-3.00	1.216 \pm 0.048	-0.087 \pm 0.117	0.990	0.084	160
4 Fl	0.10-0.60	7.860 \pm 0.278	-0.027 \pm 0.116	0.992	0.209	60
5 Fe	0.05-0.30	20.511 \pm 0.240	-0.112 \pm 0.049	0.999	0.086	10
7 Ft	0.20-0.80	5.619 \pm 0.127	0.205 \pm 0.067	0.997	0.111	40
8 P	0.20-0.80	5.205 \pm 0.081	0.214 \pm 0.043	0.998	0.070	30
9 B(a)A	0.20-0.80	13.499 \pm 0.211	-0.005 \pm 0.112	0.998	0.184	30
10 Cr	0.20-0.80	18.076 \pm 0.307	0.169 \pm 0.163	0.998	0.267	30
11 B(b)Ft	0.20-0.90	14.089 \pm 0.249	0.328 \pm 0.171	0.998	0.215	30
13 B(a)P	0.20-0.90	12.463 \pm 0.299	0.319 \pm 0.187	0.996	0.301	50
14 diB(a,h)A	0.20-0.90	2.932 \pm 0.055	-0.059 \pm 0.034	0.998	0.055	40
15 B(ghi)Per	0.20-0.90	5.639 \pm 0.160	0.124 \pm 0.103	0.995	0.146	60
16 I(1,2,3-cd)P	0.20-0.90	2.550 \pm 0.050	-0.029 \pm 0.031	0.998	0.050	40

*Error estándar de la estimación

Tabla II.7.- Determinación de HAPs, por HPLC, en disoluciones micelares de POLE. Reproducibilidad del método cromatográfico.

HAP	Reproducibilidad		
	Añadido (ppm)	Hallado (ppm)	RSD (%)
1 N	2.00	2.06	1.08
3 Ace	3.00	2.97	1.56
4 Fl	0.60	0.57	1.02
5 Fe	0.30	0.30	1.44
7 Ft	0.75	0.73	1.72
8 P	0.75	0.76	2.81
9 B(a)A	0.75	0.76	0.30
10 Cr	0.75	0.76	1.22
11 B(b)Ft	0.90	0.90	0.85
13 B(a)P	0.90	0.88	2.02
14 diB(a,h)A	0.90	0.90	2.28
15 B(ghi)Per	0.90	0.91	1.42
16 I(1,2,3-cd)P	0.90	0.93	1.45

* Media de seis determinaciones

La concentración de POLE 0.10 M (6.26%, p/v) coincide con la que posteriormente se emplea en las extracciones asistidas por ultrasonidos, mientras que las que hacen uso de la energía de microondas emplean disoluciones con una concentración de 0.02 M (1.25 %, p/v) en POLE. En atención a esta consideración, se ha querido comprobar si una modificación en el contenido de surfactante supone alguna influencia en la separación cromatográfica de los HAPs. La Figura II.3 muestra el cromatograma obtenido con una disolución de HAPs igual a la considerada anteriormente, en medio 0.02 M de POLE y 0.5% (v/v) de etanol. Los resultados

obtenidos, similares a los que se tienen con POLE 0.10 M justifican que, en las experiencias que se comentan de los apartados dedicados al desarrollo de metodologías de extracción en medio micelar de POLE, asistida por ultrasonidos y microondas, se utilice el mismo procedimiento para el análisis de los HAPs.

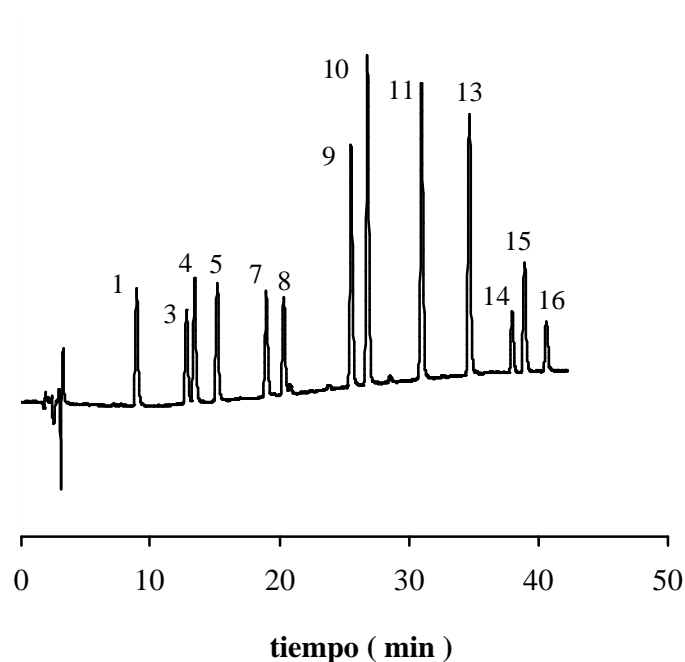


Figura II.3: Cromatograma de una disolución de HAPs disueltos en POLE 0.02 M. Para la identificación de los componentes, consultar la Parte Experimental.

II.3.1.2.- Extracción micelar asistida por ultrasonidos

-Estabilidad de los HAPs

Para comprobar la estabilidad de los HAPs seleccionados frente a la acción de los ultrasonidos, se prepararon disoluciones de los hidrocarburos en POLE 0.10 M, y se sometieron a la acción de los ultrasonidos durante 30, 40 y 60 minutos. Los resultados obtenidos se

representan en la Figura II.4.

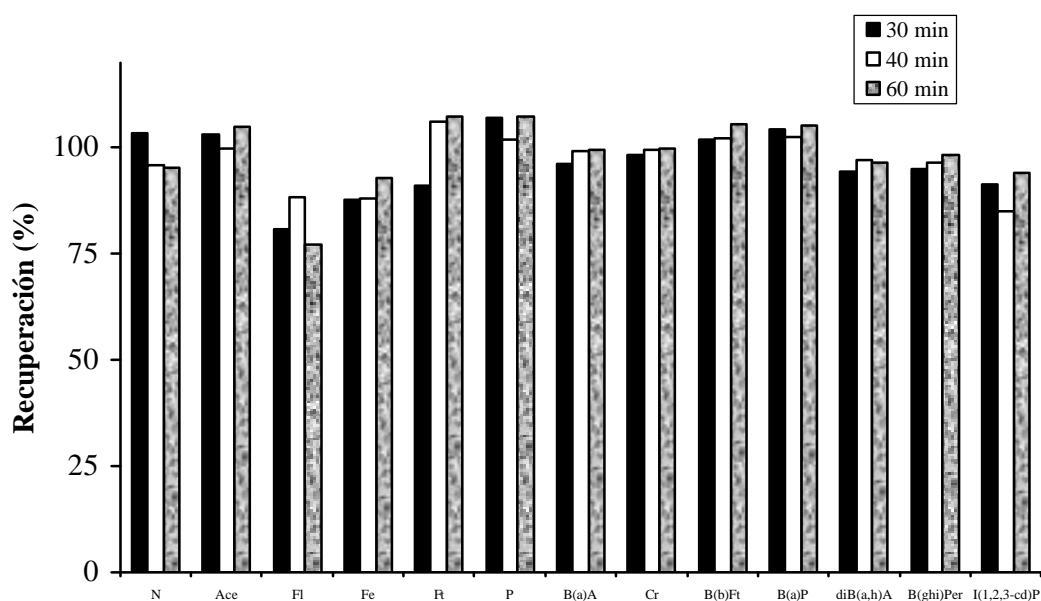


Figura II.4: Influencia del tiempo de aplicación de ultrasonidos en la estabilidad de los HAPs.

Se puede observar que el tiempo de exposición a los ultrasonidos no ejerce una influencia considerable en la estabilidad de los HAPs. Exceptuando algún valor para el fluoreno, las recuperaciones obtenidas, para cada uno de los hidrocarburos, en tales experiencias, son similares entre sí.

- Optimización de las variables experimentales

En el desarrollo de nuevos métodos analíticos, es importante establecer aquellos valores de las variables experimentales que pueden influir en la señal a medir. En tal sentido, una parte importante de los estudios a desarrollar se dirigen a la optimización de tales factores. En las estrategias tradicionales, para alcanzar las condiciones óptimas de trabajo, sólo se cambia una variable, mientras permanecen constantes el resto de factores. Esta aproximación requiere de un

gran número de experiencias, y no permite el análisis de los cambios en alguna de las respuestas, que pueden tener lugar cuando dos o más factores se modifican simultáneamente. El diseño experimental constituye una alternativa a esta estrategia, permitiendo que se puedan variar simultáneamente un gran número de factores, a la par que se estudian sus efectos.

Los diseños factoriales de dos niveles implican un número relativamente bajo de experimentos para cada variable y, del mismo modo que la optimización univariante, permite la determinación y valoración de las interacciones entre las variables, cuando los efectos de las mismas aparentan no ser aditivos.

Existen varios factores que pueden afectar potencialmente a la eficacia de la extracción asistida por ultrasonidos: concentración del surfactante, tiempo de extracción y la relación volumen de surfactante:cantidad de sedimento. En este último caso, para modificar la relación, fijamos la cantidad de sedimento (0.8 g) y variamos el volumen de surfactante. Como primera aproximación a la superficie de respuesta del método de extracción de HAPs utilizando ultrasonidos, se utilizó un diseño factorial completo de dos niveles, 2^3 , implicando 8 experimentos. Las variables estudiadas, así como sus valores (“+” representa el máximo y “-“ representa el mínimo) se muestran en la Tabla II.8. Los niveles máximos y mínimos se escogieron de acuerdo a experiencias previas en el campo de la aplicación de ultrasonidos para extracciones equiparables. La cantidad de HAPs empleada para la contaminación de las muestras de sedimento marino se mantuvo constante en las diferentes experiencias

Tabla II.8.- Extracción micelar de HAPs asistida por ultrasonidos. Diseño experimental, niveles de los factores en el diseño previo (2^3).

Factor	Clave	Menor	Mayor
		(-)	(+)
Tiempo (min)	A	2	25
Concentración del surfactante (M)	B	10^{-4}	0.1
Volumen de surfactante:cantidad de sedimento ($mL \cdot g^{-1}$)	C	6.25	18.75

Los parámetros del diseño experimental, así como las respuestas elementales obtenidas, se muestran en la Tabla II.9. En aras a obtener la mayor eficacia en los procesos de extracción en estudio, la respuesta considerada fue el promedio de recuperaciones de los distintos HAPs. Se persigue, por tanto, obtener la máxima recuperación posible de estos hidrocarburos. En los estudios de optimización no se incluyeron Naftaleno y Acenafteno, porque en experiencias previas se comprobó que sus recuperaciones eran próximas a cero. El listado de las experiencias del diseño experimental representa el orden aleatorio estadístico con que las experiencias se llevaron a cabo.

Tabla II.9.- Niveles de los factores, matriz del diseño y valores de las recuperaciones promedio de HAPs del sedimento en el primer diseño factorial.

Experimento	Factor			Recuperaciones Promedio (%)
	A	B	C	
1	+	+	-	83
2	-	+	-	63
3	+	-	+	0
4	+	+	+	77
5	-	+	+	57
6	+	-	-	0
7	-	-	-	1.2
8	-	-	+	3.7

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para estimar la significancia de los efectos principales y sus interacciones, tal y como se refleja en la Tabla II.10. En esta Tabla la suma de cuadrados fue el factor utilizado para estimar las relaciones F, es decir, las relaciones de los respectivos cuadrados medios de los efectos y el cuadrado medio del error. El valor P indica qué factor es estadísticamente significativo, y cuál no lo es. Considerando, a efectos de este trabajo,

que $P = 0.05$ es el valor límite que separa los valores significativos de los que no lo son, el análisis de los resultados muestra que el factor B (concentración del surfactante) es estadísticamente el factor más significativo. El factor A (tiempo de extracción) y la interacción de ambos A×B también son estadísticamente significativos, mientras que el resto de factores y sus interacciones no son estadísticamente significativos. El efecto de la concentración de POLE (variable B) produce un incremento de -69% en la eficiencia, independientemente de otros niveles de las variables. El porcentaje de contribución del tiempo de extracción (variable A) y la interacción A×B son bastante bajos, en torno a 9 y 11% respectivamente.

Tabla II.10.- Análisis de varianzas (ANOVA) para el primer diseño factorial.

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	P
A	152.25	1	152.25	541.34	0.027
B	9501.31	1	9501.31	33782.44	0.003
C	11.76	1	11.76	41.82	0.096
A×B	249.76	1	249.76	888.04	0.021
A×C	1.53	1	1.53	5.44	0.254
B×C	27.01	1	27.01	96.04	0.064
Error total	0.28	1	0.28		
SS* total	9943.91	7			

* Suma de cuadrados

Los resultados de este primer diseño pueden evaluarse por medio de la carta de Pareto de efectos y la superficie de respuesta estimada por el modelo, utilizando las dos variables citadas: concentración de surfactante y tiempo de extracción, como los únicos factores significativos, como se muestra en la Figura II.5. Como puede observarse, la región donde el experimento se llevó a cabo no incluye el máximo. Por tanto, se requiere de un nuevo diseño factorial dirigido en la dirección de máximo gradiente.

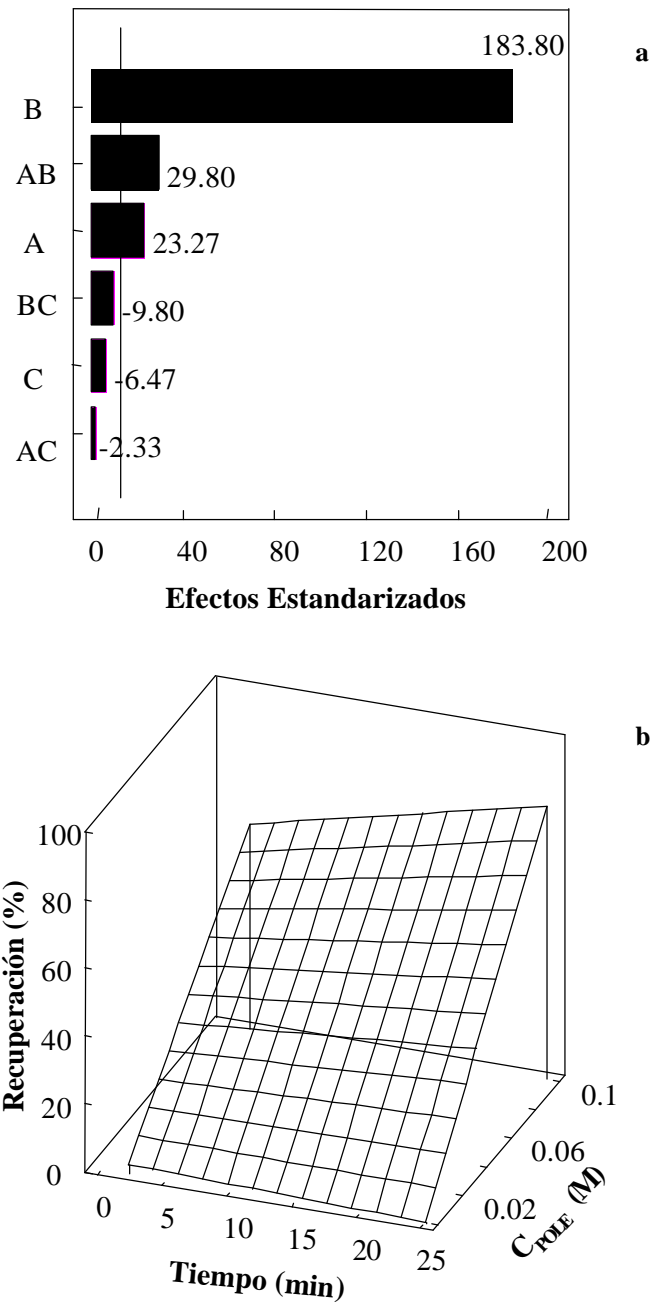


Figura II.5: Pareto (a) y superficie de respuesta (b) del diseño factorial previo para los HAPs en estudio (exceptuando naftaleno y acenafteno a la hora de calcular la media).

Con objeto de realizar una optimización más exacta, se aplicó un diseño central, $2^2 +$ estrella, con 3 puntos centrales, teniendo como efectos principales los factores que resultaron ser estadísticamente significativos: concentración de surfactante y tiempo de extracción. Este segundo diseño factorial implica un total de 11 experiencias aleatorias. La distancia axial se fijó en un valor de 1.474 para establecer la condición de ortogonalidad.

Dado que hay que fijar los factores que resultaron no ser estadísticamente significativos, la cantidad de sedimento y el volumen de surfactante se mantuvieron constantes e iguales a 0.8 g y 10 mL, respectivamente. Los factores se estudiaron a los niveles que se muestran en la Tabla II.11.

Tabla II.11.- Parámetros de la extracción y niveles de los factores utilizados en el diseño central, así como los valores óptimos hallados para la extracción ultrasónica micelar de HAPs en sedimentos marinos.

Factor	Fijados	Menor	Mayor	Óptimo
Volumen de surfactante (mL)	10			10
Cantidad de sedimento (g)	0.8			0.8
Tiempo de extracción (min)		5	25	30
$C_{POLE} (M)$		0.01	0.1	0.1

La matriz del diseño establecida a partir de los datos anteriores, así como las recuperaciones promedio que se obtuvieron al utilizar las condiciones experimentales establecidas en la extracción de HAPs, presentes en sedimentos marinos, se han agrupado en la Tabla II.12.

Tabla II.12.- Matriz del diseño y valores de respuesta en el diseño central, para las extracciones micelares de HAPs asistidas por ultrasonidos.

Experimento	Tiempo (min)	C_{POLE} (M)	Recuperaciones Promedio (%)
1	15.0	0.055	81.6
2	5.00	0.010	61.9
3	25.0	0.100	79.9
4	15.0	0.003	51.2
5	25.0	0.010	71.1
6	15.0	0.055	72.5
7	3.52	0.055	62.4
8	15.0	0.107	80.8
9	5.00	0.100	67.9
10	26.5	0.055	76.3
11	15.0	0.055	73.7

En la Figura II.6 se observa la superficie de respuesta estimada por el diseño. En esta representación se pone en evidencia que la utilización de altas concentraciones de surfactante y elevados tiempos de extracción, conducen a las mejores recuperaciones. La Figura II.6 y los datos agrupados en la Tabla II.12 pueden indicar que las recuperaciones podrían mejorarse si en las extracciones se emplearan concentraciones de POLE superiores y, especialmente, si se aumentara el tiempo de extracción.

Con objeto de comprobar la influencia del tiempo de extracción en los porcentajes de recuperación medios del conjunto de HAPs estudiados, se han realizado experiencias con disoluciones de estos hidrocarburos en las que no se han incluido naftaleno y acenafteno en atención a las consideraciones realizadas con anterioridad.

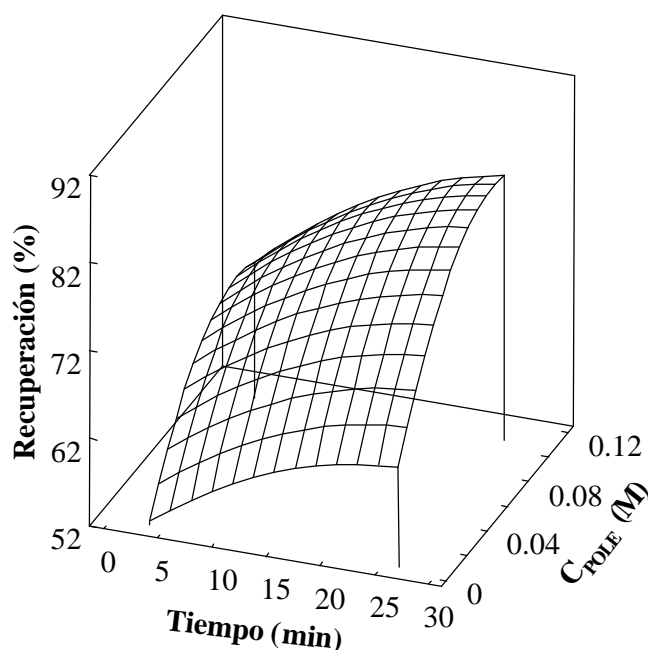


Figura II.6: Superficie de respuesta en el diseño central, para las recuperaciones medias de los HAPs (exceptuando naftaleno y acenafteno).

En la Figura II.7 puede observarse la relación existente entre el tiempo de extracción y los promedios de los porcentajes de recuperación de los hidrocarburos. Se observa que las recuperaciones de los HAPs aumentan rápidamente, al incrementarse el tiempo, hasta alcanzar los 20-25 minutos, a partir de los cuales los rendimientos no muestran diferencias significativas. Vistos los resultados obtenidos, se ha optado por utilizar, como condiciones experimentales óptimas, las incluidas en la Tabla II.11.

En la Figura II.8 se incluye un cromatograma representativo del extracto en POLE que se obtiene, tras la extracción asistida por ultrasonidos aplicada a un sedimento marino que fue previamente contaminado con una disolución patrón de HAPs, haciendo uso de todas las condiciones experimentales ya optimizadas.

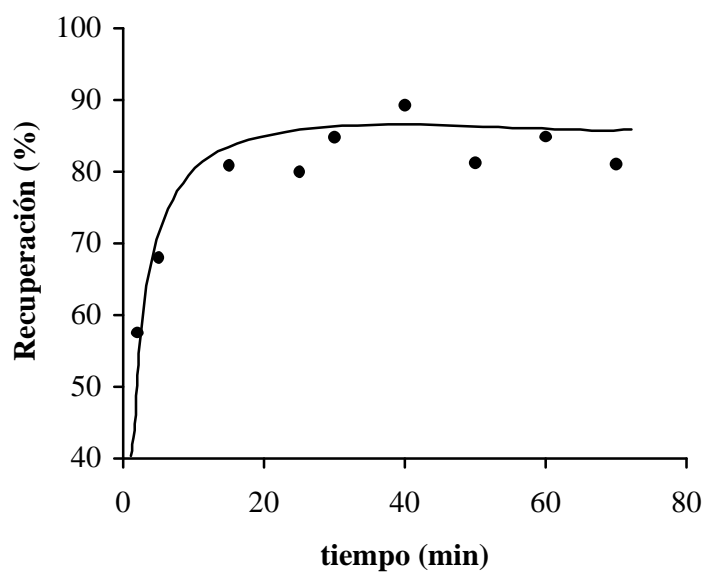


Figura II.7: Recuperaciones medias de los HAPs (exceptuando naftaleno y acenafteno) como una función del tiempo de extracción por ultrasonidos.

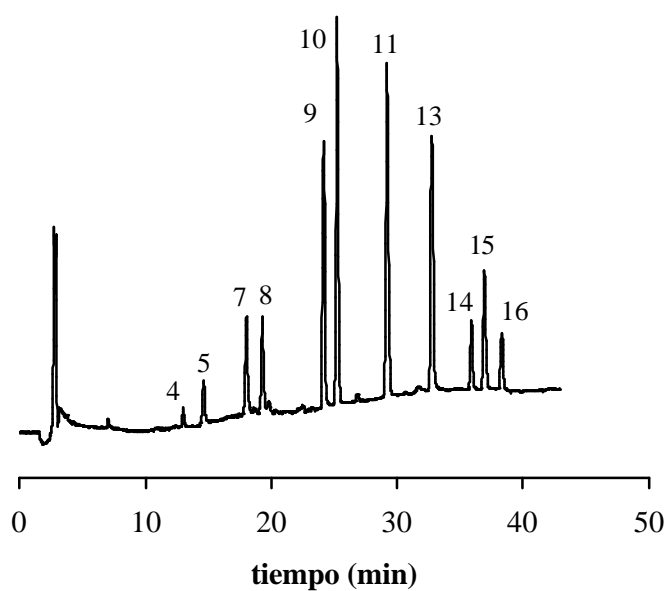


Figura II.8: Cromatograma del extracto obtenido al tratar un sedimento contaminado con HAPs con una disolución de POLE y aplicación de ultrasonidos, en las condiciones experimentales optimizadas.

- *Eficacia de la extracción*

Para determinar la eficacia y la precisión del método de extracción propuesto, se realizaron 6 extracciones independientes de los HAPs contenidos en un sedimento contaminado, utilizando las condiciones experimentales optimizadas. Los resultados promedio obtenidos se muestran en la Tabla II.13. Debe enfatizarse el hecho de que los hidrocarburos con un número de anillos superior a 3 aportan recuperaciones entre 86.70 y 106.6%. Los valores obtenidos para la desviación estándar relativa RSD(%), evidencian la reproducibilidad del método de extracción propuesto.

En la citada Tabla no se incluyen naftaleno ni acenafteno, cuyas recuperaciones sabíamos, por experiencias previas, que eran muy pequeñas. Los resultados ahora comentados muestran, además, que también fluoreno y fenantreno presentan bajas recuperaciones y altos valores de la desviación estándar relativa. De alguna forma, se pone de manifiesto que los HAPs más volátiles, de menor masa molecular, presentan recuperaciones con valores lo suficientemente pequeños como para carecer de valor analítico. A estas bajas recuperaciones pueden contribuir diferentes factores, entre los que destacan: la degradación de los HAPs, que puede tener lugar durante la extracción por ultrasonidos, debido al calentamiento, o la pérdida de los mismos durante el proceso de contaminación del sedimento.

Los resultados comentados anteriormente, junto con el hecho de que cuando se someten disoluciones de HAPs en POLE a la extracción por ultrasonidos se aprecia la considerable estabilidad de estos hidrocarburos, nos llevan a pensar que es en el proceso de contaminación del sedimento donde tienen lugar las pérdidas de los HAPs más volátiles. No obstante, otras razones pueden encontrarse en las diferentes interacciones que presentan los HAPs con la materia orgánica y/o inorgánica del sedimento, que pueden afectar a la solubilidad o difusividad de los HAPs en el medio micelar. Por otra parte, es posible que las condiciones en que se realiza la extracción no sean las más apropiadas para los HAPs ligeros.

Tabla II.13.- Recuperaciones promedio y desviaciones estándar relativas (%) para los HAPs extraídos de sedimentos contaminados, haciendo uso de extracción con POLE asistida por ultrasonidos.

HAP	Recuperaciones (%)*	RSD (%)
Indeno(1,2,3-cd)pireno	103	2.39
Benzo(ghi)perileno	97.6	2.07
Dibenzo(a,h)antraceno	98.0	3.05
Benzo(a)pireno	94.1	4.25
Benzo(b)fluoranteno	107	1.71
Criseno	99.7	3.76
Benzo(a)antraceno	99.2	2.63
Pireno	86.7	6.36
Fluoranteno	89.6	7.02
Fenantreno	33.7	10.7
Fluoreno	5.20	42.5

*Media de seis extracciones

- Influencia del tamaño de partícula del sedimento

El tamaño de partícula del sedimento es una de las características importantes de esta matriz. Algunos estudios muestran diferencias en el perfil de distribución de distintos grupos de contaminantes, como HAPs y PCBs, según el tamaño de partícula del sedimento[126,127].

En consecuencia, se ha estudiado la influencia del tamaño de partícula en la eficacia de la extracción micelar ultrasónica de HAPs, con las condiciones optimizadas ya descritas. Para ello, se han considerado 4 sub-fracciones con los siguientes tamaños de grano: 250-500 μm , 125-250 μm , 74-125 μm y <74 μm . No fue posible el estudio del sedimento en su conjunto por los

problemas de falta de homogeneidad del mismo, con la consiguiente falta de representatividad de la muestra. Las recuperaciones individuales de los HAPs encontrados en las distintas subfracciones, las recuperaciones promedio y las desviaciones estándar relativas se muestran en la Tabla II.14.

Tabla II.14.- Recuperaciones obtenidas de HAPs, en diferentes fracciones de partícula de un sedimento contaminado, mediante extracción micelar ultrasónica.

HAP	Recuperaciones (%)				Recuperaciones Promedio (%)	RSD (%)
	< 74 μm	74 - 125 μm	125 - 250 μm	250 - 500 μm		
Fl	4.40	2.70	3.20	43.4	13.43	149
Fe	32.4	28.6	30.7	74.6	41.58	53.1
Ft	70.7	74.6	83.7	95.8	81.20	13.7
P	68.6	81.8	82.0	97.1	82.38	14.1
B(a)A	87.2	98.6	98.8	102	96.53	6.58
Cr	91.0	98.7	100	101	97.70	4.66
B(b)Ft	96.8	105	107	107	104.0	4.70
B(a)P	87.2	94.4	94.6	104	95.13	7.38
diB(a,h)A	86.7	98.4	99.3	97.3	95.43	6.16
B(ghi)Per	85.6	95.7	97.9	97.3	93.80	5.92
I(1,2,3-cd)P	91.2	105	108	98.7	100.8	7.42
R (%)*	85.00	94.73	96.91	99.77		
RSD (%)	11.01	10.80	9.36	3.80		

*Valores de recuperaciones medias para HAPs con un número de anillos superior a tres.

Como tendencia general, se constata que las mayores recuperaciones corresponden a extracciones efectuadas en las muestras con mayor tamaño de partícula del sedimento, o lo que es lo mismo, es posible generalizar diciendo que los HAPs se encuentran más retenidos al sedimento al disminuir el tamaño de partícula del mismo.

Al considerar de forma independiente el comportamiento del fluoreno y del fenantreno, se observa que en las muestras asimilables a arena, en atención al tamaño de partícula, las recuperaciones que se obtienen son muy superiores a las obtenidas en las restantes granulometrías. La fuerza con la cual parecen quedar enlazados estos HAPs a las fracciones de mayor tamaño del sedimento podría justificar, al menos parcialmente, las bajas recuperaciones que habíamos comentado.

Para los restantes hidrocarburos, las recuperaciones obtenidas para muestras con tamaño de partícula comprendido entre 250 y 500 μm es superior al 95% en todos los casos. Sin embargo, cuando el tamaño de partícula es menor de 74 μm , las recuperaciones máximas alcanzadas son del 96.8% para el benzo(b)fluoranteno, mientras que para fluoranteno y pireno los valores obtenidos se aproximan al 70%.

En cualquier caso, al contrario de las previsiones que suelen hacerse, las mejores recuperaciones, con independencia del tamaño de partícula, corresponden a los compuestos de mayor peso molecular.

Las desviaciones estándar relativas de las recuperaciones promedio de cada HAP son muy diferentes y superiores a aquellas que se obtenían en el estudio de reproducibilidad del método de extracción propuesto (Tabla II.13). De alguna forma, este hecho viene a señalar la dependencia de la eficacia de la extracción con la naturaleza del hidrocarburo y con el tamaño de partícula de la subfracción de sedimento considerada.

Considerando los HAPs con un número de anillos superior a tres, todas las recuperaciones son superiores al 70%, aunque en las fracciones más finas parece ser más difícil la extracción. Las recuperaciones promedio obtenidas para cada sub-fracción oscilan entre 86.1 y 99.9%, con valores de RSD(%) que varían entre 11.8 y 3.66%, respectivamente, para las fracciones de tamaño < 74 μm y 250-500 μm , respectivamente.

- *Influencia de la mezcla de surfactantes*

Existen estudios que ponen de manifiesto un aumento en las recuperaciones, cuando en las extracciones se utilizan mezclas de surfactantes. Para comprobar esta observación, se realizaron experiencias en las que a las disoluciones de POLE se adicionaron tanto surfactantes aniónicos como catiónicos. El surfactante aniónico seleccionado fue el dodecil sulfato sódico (LSS), y el surfactante catiónico elegido fue el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). Manteniendo el conjunto de condiciones optimizadas (tipo de sedimento, condiciones óptimas de extracción, etc.), se disolvieron distintas cantidades de CTAB y LSS en POLE 0.1 M, obteniendo así disoluciones que se utilizaron para la extracción de HAPs contenidos en sedimentos previamente contaminados. Para tres concentraciones diferentes de surfactante iónico: $10^{-2}M$, $10^{-3}M$ y $10^{-4}M$, se obtuvieron los porcentajes de recuperación para cada HAP que se muestran en la Tabla II.15. Los resultados obtenidos señalan que las recuperaciones son totalmente comparables a las que se alcanzan cuando las disoluciones sólo contienen POLE, y que no existen prácticamente diferencias en emplear una concentración u otra de los surfactantes iónicos estudiados. Como hechos puntuales, puede mencionarse que para la concentración mayor de CTAB se obtienen recuperaciones algo peores, y que las recuperaciones del fluoreno aumentan hasta un 30% utilizando estos medios.

Tabla II.15.- Recuperaciones de HAPs contenidos en sedimentos, con la utilización de POLE 0.10 M y distintas concentraciones de CTAB y LSS, aplicando extracción ultrasónica.

HAPs	CTAB						LSS					
	10 ⁻⁴ M	10 ⁻³ M	10 ⁻² M	Media	SD	RSD (%)	10 ⁻⁴ M	10 ⁻³ M	10 ⁻² M	Media	SD	RSD (%)
Fl	29.4	32.2	36.1	32.6	3.4	10	24.2	32.8	30.9	29.3	4.5	15
Fe	36.8	36.8	35.0	36.2	1.0	2.9	36.7	38.6	35.2	36.8	1.7	4.6
Ft	87.3	80.7	83.7	83.9	3.3	3.9	82.3	83.6	81.5	82.5	1.1	1.3
P	86.5	83.0	84.9	84.8	1.8	2.1	80.9	80.2	81.7	80.9	0.8	0.9
B(a)A	98.7	100	93.3	97.4	3.6	3.7	99.7	98.4	99.6	99.2	0.7	0.7
Cr	103	104	97.5	101	3.4	3.3	102	103	104	103	1.2	1.2
B(b)Ft	106	107	96.7	103	5.6	5.4	105	103	106	105	1.6	1.5
B(a)P	91.2	99.6	76.8	89.2	12	13	85.3	77.2	77.8	80.1	4.5	5.6
diB(ah)A	102	98.2	95.2	98.5	3.5	3.6	97.2	99.6	101	99.3	2.0	2.0
B(ghi)Per	98.0	100	88.4	95.5	6.2	6.5	98.0	100	97.4	98.5	1.5	1.5
I(1,2,3-cd)P	101	99.1	85.9	95.4	8.3	8.7	98.0	94.6	99.1	97.2	2.3	2.4

- Influencia de la adición de electrolitos

Por último, se ensayó la influencia que diversos electrolitos como: cloruro sódico, cloruro magnésico hexahidratado, nitrato sódico y sulfato sódico anhidro, pueden ejercer en las recuperaciones de los HAPs, siguiendo el procedimiento que estamos estudiando. Del mismo modo que en experiencias anteriores, se utilizan el conjunto de condiciones optimizadas, siendo el único cambio la incorporación de una determinada cantidad de cada una de las sales citadas a la disolución de POLE empleada como extractante. Este estudio se realizó con el empleo de dos concentraciones de cada uno de los electrolitos, 0.10 M y 0.01 M. Los resultados obtenidos para las recuperaciones de los distintos HAPs en estas condiciones experimentales se muestran en la Tabla II.16.

Con respecto a los cromatogramas obtenidos, se obtuvieron deformaciones en los picos cromatográficos correspondientes a los HAPs más ligeros cuando a las disoluciones de POLE se agrega NaCl o MgCl₂.6H₂O.

En cuanto al efecto que las distintas sales ejercen en los porcentajes de recuperación de los hidrocarburos, y como resultado más significativo, puede mencionarse el considerable aumento que experimentan las recuperaciones del fluoreno, aunque la eficacia sigue siendo baja, así como el empeoramiento que experimentan las correspondientes al fluoranteno y al pireno. De resto, los valores obtenidos son equiparables a los que se obtenían con disoluciones de POLE exentas de sales inorgánicas.

Tabla II.16.- Efecto de la adición de electrolitos en las recuperaciones de HAPs presentes en sedimentos previamente contaminados, aplicando extracción micelar ultrasónica.

HAP	NaCl		MgCl ₂ ·6H ₂ O		NaNO ₃		Na ₂ SO ₄	
	0.01 M	0.1 M	0.01 M	0.1 M	0.01 M	0.1 M	0.01 M	0.1 M
Fl	27.8	0	22.9	36.1	26.4	26.4	25.2	31.6
Fe	33.3	17.6	19.9	25.0	39.4	33.0	41.6	36.2
Ft	74.5	49.0	38.6	55.7	84.2	84.6	89.5	85.2
P	61.2	48.9	41.5	59.9	92.7	95.6	101	102
B(a)A	95.2	98.6	98.5	102	96.9	96.9	101	99.0
Cr	99.9	103	102	106	103	102	105	102
B(b)Ft	104	106	104	109	108	104	110	105
B(a)P	80.9	85.9	88.5	102	80.5	66.2	71.8	70.6
diB(ah)A	98.7	100	91.0	93.8	99.6	96.3	110	103
B(ghi)Per	102	98.6	96.7	99.1	97.8	93.0	101	88.2
I(1,2,3-cd)P	98.4	110	96.3	101	103.4	96.1	94.4	97.1

II.3.1.3.- *Extracción asistida por microondas*

- Estabilidad de los HAPs

Es conocido que bajo la acción de la radiación de microondas diversas sustancias muestran inestabilidad. Con objeto de comprobar el comportamiento de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en las condiciones experimentales en que se efectúan los estudios expuestos a continuación, se prepararon disoluciones de estos hidrocarburos en POLE, se introdujeron en los correspondientes reactores y se sometieron a la radiación de microondas, empleando condiciones experimentales equiparables a las empleadas en los procesos de extracción que se comentan posteriormente. Los resultados obtenidos muestran que, a las potencias y tiempos utilizados, así como a la presión máxima que se alcanza en el interior del vaso reactor, las disoluciones de los HAPs estudiados pueden considerarse estables.

- Optimización de las variables experimentales

El uso de un diseño factorial para encontrar los valores más adecuados de las variables que afectan a la extracción asistida por microondas, permite una consideración global del número de experimentos a realizar, y de los posibles efectos de interacción entre las variables seleccionadas. La aplicación de una aproximación estadística, como es el diseño factorial, permite disminuir el tiempo de puesta a punto del método, así como proporcionar datos menos ambiguos.

Existen diferentes variables que, en principio, pueden afectar la eficacia de la extracción: concentración de surfactante, presión máxima en el interior de los vasos, tiempo durante el cual la presión máxima en el interior de los vasos se mantiene constante, denominado TAP, y potencia del horno de microondas. Como primera aproximación a la obtención de una superficie de respuesta representativa del proceso de extracción de microondas, se utilizó un diseño factorial completo de dos niveles, 2^4 (dos niveles, cuatro variables), que consta de 16 experimentos. Los valores máximos y mínimos dados a cada factor fueron: 10^{-4} y 10^{-1} M para la concentración de POLE, 1.35 y 3.38 bares para la presión en el interior de los vasos reactores, 0 y 10 minutos de

TAP, 20 y 80% de potencia máxima de microondas. El resto de variables implicadas en el proceso de extracción se mantuvieron constantes: volumen de surfactante (10 mL), cantidad de sedimento (0.8 g) y cantidad de HAPs utilizada para la contaminación del sedimento.

La recuperación de cada HAP (y no la recuperación promedio de los HAPs, tal y como se utilizó en la extracción micelar ultrasónica) se ha tomado como el valor de respuesta que utilizamos en este diseño, siendo el objetivo, en todos los casos, alcanzar la máxima respuesta posible. Los parámetros del diseño experimental y sus respuestas elementales, es decir, las recuperaciones obtenidas para cada HAP, se muestran en las Tablas II.17 y II.18. El orden del listado en estas tablas indica, exclusivamente, el orden, escogido al azar, en que los tratamientos experimentales fueron llevados a cabo. En dichas Tablas no se han incluido los siguientes HAPs: naftaleno, acenafteno y fluoreno, porque sus recuperaciones fueron siempre próximas a cero.

Tabla II.17.- Extracción micelar de HAPs asistida por microondas. Valores de los parámetros experimentales incluidos en el diseño previo (2⁴).

Exp	Potencia (%)	P _{max} (bar)	TAP (min)	C _{POLE} ·10 ³ (M)
1	20	3.38	0	0.1
2	80	3.38	10	100
3	20	1.35	10	100
4	80	3.38	10	0.1
5	80	1.35	10	0.1
6	20	3.38	10	100
7	20	1.35	0	100
8	80	1.35	0	100
9	80	1.35	10	100
10	20	3.38	0	100
11	20	3.38	10	0.1
12	20	1.35	10	0.1
13	80	3.38	0	100
14	80	3.38	0	0.1
15	80	1.35	0	0.1
16	20	1.35	0	0.1

Tabla II.18.- Valores respuesta, expresados como porcentaje de recuperación, obtenidos al aplicar el diseño “screening” (2⁴), (EAM).

Exp	Fe	Ft	P	B(a)A	Cr	B(b)Ft	B(a)P	diB(a,h)A	B(ghi)Per	I(1,2,3,-cd)P
1	0	0	0	0	13.3	7.00	0	14.3	20.6	0
2	0	0	0	12.4	27.5	34.8	21.9	52.5	59.1	40.1
3	51.0	61.2	60.3	68.8	77.2	64.6	65.0	67.6	74.3	41.5
4	29.9	26.0	29.8	26.5	46.1	30.9	13.4	33.9	42.6	17.7
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	10.0	2.91	0	7.91	16.1	0
7	0	0	0	2.82	33.1	15.3	0	4.90	26.4	0
8	48.3	84.3	102	105	110	104	89.7	93.7	105	90.8
9	10.6	33.6	33.6	0	56.0	57.5	0	20.9	0	0
10	47.9	60.2	60.2	62.0	67.8	63.5	43.2	61.6	68.4	46.2
11	56.2	61.9	61.9	42.3	77.8	64.2	21.0	52.0	64.7	22.5
12	0	0.10	0.10	0	10.0	4.44	0	0	7.72	0
13	20.8	32.1	32.1	0	49.9	43.2	0	13.6	0	0.10
14	0	0.10	0.10	0	8.43	9.00	0	4.32	0	0
15	4.40	3.80	3.80	13.1	12.1	25.0	24.9	7.11	17.4	11.8
16	2.70	1.40	1.41	10.1	22.9	11.1	13.2	15.7	19.7	10.0

En la Tabla II.19 se muestran los efectos principales y las interacciones entre los distintos efectos que se obtienen. En todos los casos, el efecto principal es la concentración de POLE, mientras que el resto de factores, y las interacciones entre ellos, no son estadísticamente significativas ($P = 0.05$). A pesar de esta consideración, puede indicarse que para la mayoría de los hidrocarburos estudiados, se encuentra que el segundo factor en importancia es la presión máxima en el interior de los vasos. La superficie de respuesta que se obtiene con este modelo experimental, haciendo uso de estas dos variables, concentración de POLE y presión máxima en el interior de los vasos, se muestra en la Figura II.9. En dicha Figura se observa que la región donde se llevaron a cabo los experimentos no incluye el óptimo operacional. No obstante, este diseño previo nos ha permitido encontrar las variables significativas, que serán las que nos permitan alcanzar el óptimo de trabajo.

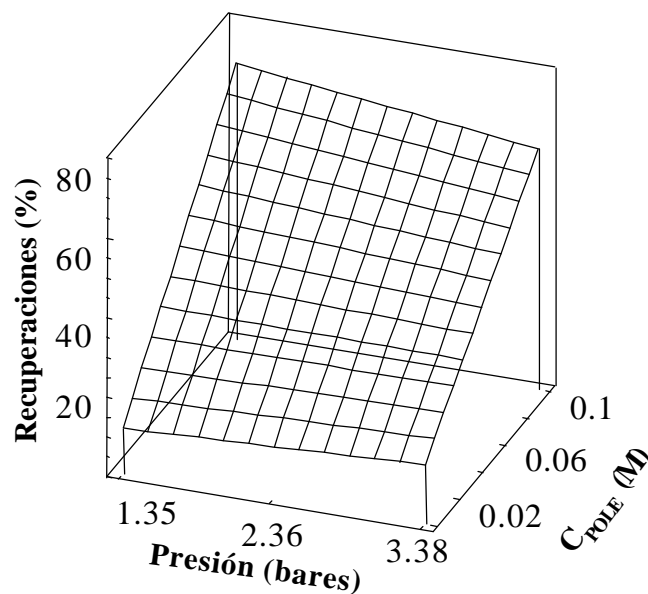


Figura II.9: Extracción micelar de HAPs asistida por microondas. Superficie de respuesta representativa de la aplicación del diseño previo (2^4).

Tabla II.19.- Efectos estimados e interacciones sobre las recuperaciones de los HAPs, en la extracción micelar asistida por microondas.

Efectos	Fe	Ft	P	B(a)A	Cr	B(b)Ft	B(a)P	diB(a,h)A	B(ghi)Per	I(1,2,3-cd)P
Potencia (%)	-5.47	-0.61	1.69	-3.66	-0.21	8.89	0.94	0.25	-9.25	6.28
P_{Max} (bar)	4.73	-0.51	-4.79	-7.04	-2.61	-3.26	-11.7	3.78	2.65	-2.20
TAP (min)	2.94	0.11	-6.14	-5.34	-1.66	-2.31	-6.21	2.45	0.90	-3.40
C_{POLE} (M)	32.2	44.2	39.7	33.9	51.8	43.6	21.5	30.8	30.1	20.8
Potencia \times P_{Max}	-7.88	-15.4	-15.9	-12.7	-9.04	-13.8	-8.16	-8.12	-7.78	-8.98
Potencia \times TAP	-11.2	-15.3	-17.1	-14.4	-11.1	-12.1	-13.6	-5.30	-6.02	-7.82
Potencia \times C_{POLE}	-8.89	-1.21	-1.56	-7.51	1.84	-1.96	-7.46	-6.25	-12.4	-6.68
P_{max} \times TAP	1.41	-1.24	4.91	10.1	7.16	4.84	9.49	10.7	22.5	11.9
P_{max} \times C_{POLE}	6.51	0.79	-0.14	-4.34	-6.16	-6.56	-7.61	-10.3	-10.1	-9.25
TAP \times C_{POLE}	4.72	1.41	2.61	-2.64	0.64	0.19	-2.16	-2.30	-5.40	-10.4

En atención a lo expuesto, a continuación se ha desarrollado un diseño factorial de dos niveles relacionado con el utilizado previamente, orientado en la dirección del gradiente máximo. En este caso se mantienen constantes la potencia de microondas y el TAP, variables que demostraron no ser significativas en el diseño previo, con objeto de acortar el número de variables y poder centrarnos en localizar el máximo. De estas variables, la primera se relaciona con la velocidad de calentamiento del horno. Por otra parte, el horno de microondas de que disponemos no nos permite controlar la temperatura, que sí es la variable importante, por lo que hemos de trabajar con la presión máxima en el interior de los reactores. La potencia de microondas se fija al 60%, que es lo suficientemente alta como para minimizar el tiempo total de extracción. El TAP se fija en 5 minutos, para asegurar la extracción cuantitativa de los HAPs. En este caso se emplea un diseño experimental central, $2^2 +$ estrellas (2 niveles, 2 variables), con 3 puntos centrales, dando lugar a 11 experimentos aleatorios. La Tabla II.20 muestra los niveles usados en este diseño. Los resultados que se obtienen, así como la correspondiente matriz del diseño, se muestran en la Tabla II.21.

Tabla II.20.- Parámetros de extracción y niveles en los factores empleados en el diseño central, así como los valores óptimos para la extracción de HAPs asistida por microondas.

Factor	Fijados	Menor	Mayor	Central	Óptimo
Potencia(%)	60				60
P_{\max} (bar)		2.03	5.41	3.72	2.03
TAP(min)	5				5
$C_{\text{POLE}} \cdot 10^3 (M)$		5	100	52.5	20

Tabla II.21.- Extracción micelar de HAPs asistida por microondas. Diseño de la matriz y valores respuesta en el diseño central.

Diseño		Recuperaciones (%)									
C_{POLE} (M)	P_{max} (bar)	Fe	Ft	P	B(a)A	Cr	B(b)Ft	B(a)P	diB(a,h)A	B(ghi)Per	I(1,2,3-cd)P
0.0525	3.72	42.9	65.8	32.3	64.2	74.8	57.5	40.1	66.5	76.2	67.9
0.005	5.41	0	0	0.10	63.5	0	32.4	0.10	47.6	47.1	0
0.0525	2.03	58.4	67.5	61.2	70.1	72.8	52.6	62.7	68.3	66.7	72.4
0.1	2.03	52.4	43.8	41.0	32.7	56.8	12.8	10.5	46.4	47.9	28.9
0.1	3.72	29.7	31.8	0.10	12.9	44.8	4.71	0.10	30.1	27.7	24.2
0.0525	3.72	56.0	60.6	55.9	60.4	69.1	46.3	43.5	67.5	63.8	57.4
0.005	3.72	17.0	0	19.1	13.0	52.6	28.7	0.10	60.6	37.9	35.2
0.0525	5.41	29.0	36.9	0	17.3	50.9	20.5	1.51	38.4	32.4	31.9
0.1	5.41	35.4	31.9	21.6	26.6	43.0	5.52	2.62	35.8	31.0	26.4
0.005	2.03	38.5	62.6	58.4	74.7	86.2	74.7	56.2	86.9	85.3	84.4
0.0525	3.72	59.2	98.3	33.4	73.4	106	101	0.10	98.5	91.0	85.8

La Figura II.10 muestra la superficie de respuesta obtenida para el criseno, tomada como ejemplo, con este nuevo modelo. En dicha Figura se puede observar un máximo, en la región de bajas concentraciones de surfactante y bajas presiones máximas en el interior de los vasos. A altas presiones, las recuperaciones son bajas, probablemente debido a procesos de degradación a que se ven sometidos los HAPs, por las temperaturas alcanzadas en el interior de los vasos.

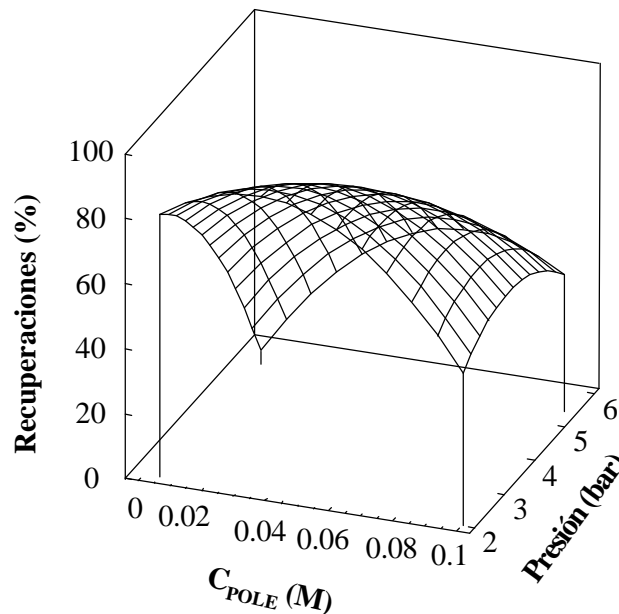


Figura II.10: Superficie de respuesta del criseno, puesto a modo de ejemplo, con la aplicación del diseño central.

Para los diferentes HAPs estudiados, los valores óptimos para la concentración de POLE, claramente visibles en la superficie de respuesta, oscilan entre 0.01 y 0.04 M, mientras que el valor óptimo de presión máxima fue siempre de 2.03 bares. Para encontrar la concentración de surfactante más adecuada para este estudio, se realizaron experiencias con cuatro concentraciones diferentes de surfactante: 0.04, 0.03, 0.02 y 0.01 M. Para estas concentraciones, los valores correspondientes a las recuperaciones de los distintos hidrocarburos presentan diferencias entre 3 y 12%, aunque las mejores recuperaciones se obtuvieron siempre con una concentración de surfactante de 0.02 M.

De acuerdo con los resultados indicados, las condiciones experimentales óptimas de trabajo son las que se señalan en la Tabla II.20.

Para determinar la precisión del método de extracción, se efectuaron seis extracciones independientes manteniendo fijas las condiciones experimentales optimizadas. La Tabla II.22 muestra los resultados promedio obtenidos. Debe enfatizarse que los HAPs con un número de anillos superior a 3 presentan recuperaciones que oscilan entre 85.70 y 100.7%. Asimismo, los valores de desviación estándar relativa muestran que, en general, la reproducibilidad del método de extracción propuesto, para los hidrocarburos señalados, es elevada.

Tabla II.22.- Recuperaciones medias y desviaciones estándar relativas para los HAPs estudiados, extraídos con un medio micelar de POLE en un sistema de microondas.

HAP	Recuperaciones(%)*	RSD (%)
Indeno(1,2,3-cd)pireno	96.0	4.02
Benzo(ghi)perileno	98.4	3.93
Dibenzo(a,h)antraceno	99.4	3.48
Benzo(a)pireno	84.4	5.77
Benzo(b)fluoranteno	101	3.51
Criseno	95.0	1.70
Benzo(a)antraceno	85.7	3.78
Pireno	87.8	6.58
Fluoranteno	87.8	7.00
Fenantreno	49.4	29.4
Fluoreno	11.5	62.1
Acenafteno	6.42	116

*Media de seis extracciones

Los HAPs más volátiles, tales como fenantreno, fluoreno y acenafteno, muestran bajas recuperaciones que oscilan entre 49.4 y 6.42%, respectivamente, mientras que para otros hidrocarburos, como el naftaleno, las recuperaciones obtenidas son próximas a cero. Hay diferentes motivos que pueden contribuir a estas bajas recuperaciones: la degradación de HAPs que puede tener lugar al utilizar radiación de microondas, por la presión y temperatura que se alcanza en el interior de los vasos, así como la pérdida de HAPs durante el proceso de contaminación del sedimento.

Las experiencias realizadas con los HAPs disueltos en el medio micelar de POLE sometidos a las condiciones experimentales establecidas en el proceso de optimización del método, pusieron de manifiesto que, en general, los hidrocarburos pueden considerarse estables frente a la radiación de microondas. Estos resultados indicarían que es durante el proceso de contaminación del sedimento, tal y como se explica en la Parte Experimental, donde algunos HAPs, y especialmente los ligeros, pueden haberse volatilizado. Otro hecho a considerar para justificar las pobres recuperaciones de los HAPs más ligeros, serían las diferentes interacciones que presentan los hidrocarburos con la materia orgánica e inorgánica presente en el sedimento, que afecta a la solubilidad o difusividad de los HAPs en el medio micelar. En este supuesto, cabría plantearse que las condiciones extractivas no son las más adecuadas para los HAPs más ligeros.

- Influencia de la cantidad de muestra

Con objeto de comprobar si una modificación en la cantidad de muestra puede provocar cambios en las condiciones óptimas de extracción, se realizaron un conjunto de experimentos utilizando cantidades de muestra que oscilaron entre 0.3 y 5.0 g, empleando las condiciones de extracción optimizadas en su momento para 0.8 g. Los resultados que se obtienen para cantidades de muestra inferiores a 3 g no presentan diferencias significativas. Para cantidades de muestra superiores, los resultados indican que para mejorar las recuperaciones se necesitarían mayores tiempos de extracción. Esta tendencia queda claramente reflejada en la Figura II.11.

- Extracciones simultáneas

Una de las ventajas principales de los procesos de extracción realizados con el empleo de radiación de microondas, es la posibilidad de llevar a cabo varias extracciones simultáneamente. Todos los estudios de extracción comentados anteriormente se realizaron colocando un vaso reactor, con la muestra de sedimento y el extractante, en el horno de microondas. Un aumento en el número de reactores en la cavidad del horno implica que existirá un cierto reparto de la energía de microondas entre el conjunto de reactores, con lo cual podría pensarse en un alejamiento de las condiciones óptimas de extracción. Al realizar extracciones simultáneas se pone de manifiesto, a nivel experimental, que no es necesario un cambio en las condiciones óptimas de trabajo previamente establecidas. Además, las recuperaciones que se obtienen son similares a las que se producen cuando se efectúa una extracción aislada. La única diferencia estriba en que, en este caso, hay que aumentar el tiempo total de residencia de los vasos de reacción en el horno de microondas hasta 10 min, en comparación con los 6 minutos que se requerían con una extracción individual. En la Figura II.12 se muestra la variación de la presión en el interior de cada recipiente cuando se introducen 1 ó 6 vasos en el horno. Una opción para reducir el tiempo total de residencia, cuando se incrementa el número de vasos, puede ser incrementar la potencia del horno de microondas, lo que permitiría alcanzar la presión máxima de 2.03 bares en un tiempo menor.

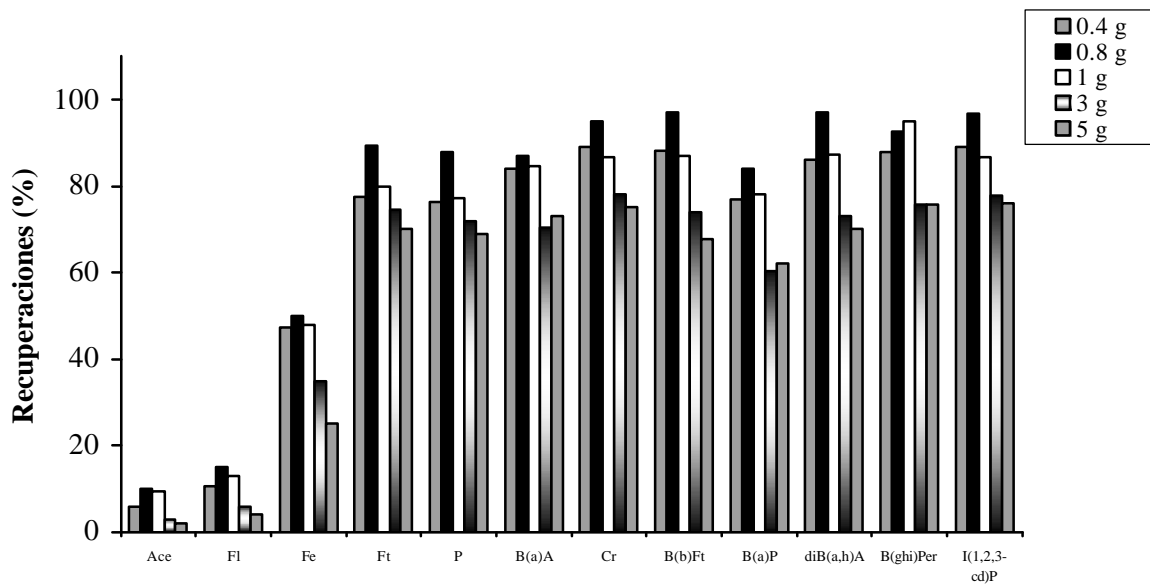


Figura II.11: Influencia de la cantidad de sedimento utilizada en las recuperaciones de los HAPs, empleando las condiciones optimizadas para 0.8 g de sedimento.

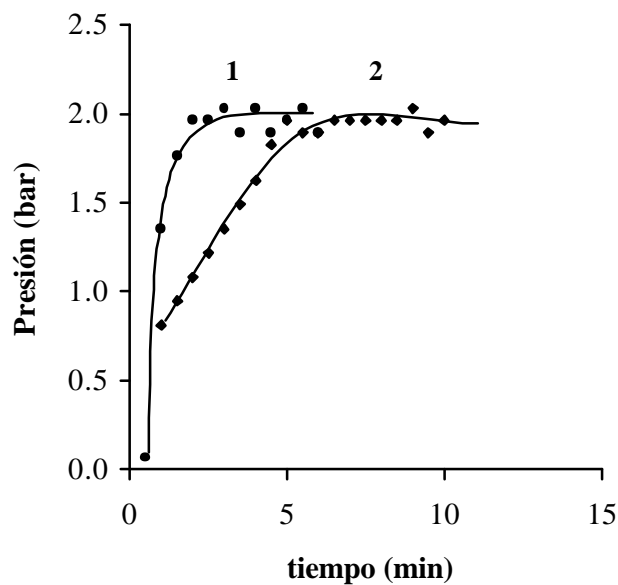


Figura II.12: Variación de la presión en el interior de los reactores con respecto al tiempo de residencia en el horno, cuando se incrementa el número de reactores en la cavidad del microondas, con el consiguiente retraso en alcanzar la presión máxima establecida. (1) 1 reactores y (2) 6 reactores.

II.3.1.4.- *Comparación de los métodos de extracción asistida por microondas y por ultrasonidos*

En los apartados previos hemos propuesto la extracción de HAPs de sedimentos marinos haciendo uso de extracciones asistidas por microondas y por ultrasonidos, con un medio micelar de POLE, como paso previo a la determinación de los hidrocarburos por HPLC con detección UV. En ambos métodos, el conjunto de condiciones experimentales óptimas se estableció mediante la aplicación de diseños factoriales. El objetivo de la optimización realizada consistió en obtener la máxima recuperación de cada uno de los HAPs utilizados en la contaminación de los sedimentos marinos.

Con objeto de comprobar ambas metodologías, en la Tabla II.23 se han resumido las condiciones experimentales para la extracción de HAPs con POLE, ayudadas por la radiación de microondas o ultrasonidos. Puede observarse que, para la misma cantidad de sedimento, la extracción asistida por ultrasonidos requiere una mayor concentración de surfactante y mayores tiempos de extracción.

Tabla II.23.- Parámetros óptimos de los métodos de extracción asistidos por microondas y por ultrasonidos.

Parámetro	Sistema de Extracción	
	Microondas	Ultrasonidos
Tiempo de extracción (min)	5	30 (210)
Volumen de extractante (mL)	10	10
Concentración de extractante (<i>M</i>)	0.02	0.10
Presión máxima (bar)	2.03	--
Potencia (W)	378	--
Cantidad de muestra (mg)	800 (100)	800 (100)

Los valores entre paréntesis se refieren a las condiciones de extracción para el sedimento de referencia.

Por otra parte, como puede observarse de los datos de la Tabla II.24, hay diferencias significativas entre la eficacia de las extracciones que se alcanzan para los HAPs de bajo peso molecular y para los que poseen un número de anillos superior a tres. Cuando se realizan seis extracciones independientes de sedimentos contaminados, la comparación de las recuperaciones de los HAPs pone de manifiesto que existen importantes pérdidas de los HAPs más volátiles. Entre ellos, naftaleno y acenafteno presentan recuperaciones próximas a cero. Fluoreno y fenantreno, utilizando microondas y ultrasonidos, muestran recuperaciones máximas del 49 y 34% respectivamente. Existen diferentes razones que pueden contribuir a las bajas recuperaciones de los HAPs más volátiles. En apartados anteriores se han comentado algunas de ellas, relacionadas con el proceso de contaminación del sedimento, o con la degradación favorecida por la acción de la radiación de microondas o de ultrasonidos. Como ya se ha indicado, las interacciones que los HAPs presentan con la materia orgánica y/o inorgánica del sedimento, que pueden influenciar su solubilidad o difusividad en el medio micelar, pueden ejercer una influencia importante en los procesos de extracción comentados.

En cambio, los HAPs con un número de anillos superior a tres muestran porcentajes de recuperación superiores al 85%. Al comparar ambos métodos se observa que las recuperaciones promedio son ligeramente superiores en la extracción asistida por ultrasonidos, si bien presentan desviaciones estándar similares.

Por otra parte, las recuperaciones promedio han sido evaluadas para cada método de extracción individual, utilizando como parámetro representativo el error sistemático constante:

$$D_{\text{rel}} (\%) = [(X_1 - X_2) / X_1] \cdot 100$$

siendo X_1 y X_2 las recuperaciones de cada HAP en la extracción asistida por microondas y por ultrasonidos, respectivamente.

Tabla II.24.- Recuperaciones promedio y porcentajes de RSDs de los HAPs después de la extracción asistida por microondas y ultrasonidos.

HAPs	Extracción por microondas		Extracción ultrasónica		D _{rel}
	Recuperaciones (%)	RSD (%)	Recuperaciones (%)	RSD (%)	
Fl	11.5	62.1	5.20	42.5	54.8
Fe	49.4	29.4	33.7	10.7	31.8
Ft	87.8	7.00	89.6	7.02	-2.06
P	87.8	6.58	86.7	6.36	1.29
B(a)A	85.7	3.78	99.2	2.63	-15.8
Cr	95.0	1.78	99.7	3.76	-4.90
B(b)Ft	101	3.51	107	1.71	-5.83
B(a)P	84.4	5.77	94.1	4.25	-11.6
diB(a,h)A	99.4	3.48	98.0	3.05	1.44
B(ghi)Per	98.4	3.93	97.6	2.07	0.91
I(1,2,3-cd)P	96.0	4.02	103	2.40	-7.46
Recuperaciones (%)*	92.81		97.18		
SD*	6.38		6.25		
t experimental	3.38		1.35		
F experimental		1.04			

*Valores promedio para las recuperaciones y desviaciones estándar de HAPs con un número de anillos superior a tres.

$$t_{0.05,8} = 2.31, F_{0.05,8,8} = 4.433$$

Aquellos HAPs con un número de anillos superior a tres como pireno, dibenzo(a,h)antraceno y benzo(ghi)perileno aportan valores para D_{rel} inferiores al 2%. HAPs como fluoreno y fenantreno dan valores para D_{rel} de 54.8 y 31.8% respectivamente, pero la eficacia de la extracción no es muy buena. Para el resto de los hidrocarburos se obtienen valores negativos de D_{rel} que oscilan entre 2 y 16%, poniéndose de manifiesto que la extracción asistida por ultrasonidos es más eficaz que la extracción asistida por microondas.

Teniendo en cuenta las recuperaciones medias para los hidrocarburos con un número de anillos superior a tres, el test Student muestra que no hay diferencias significativas ($P = 0.05$) entre las recuperaciones medias halladas en la extracción asistida por ultrasonidos y el valor teórico de 100%. En cambio, el test F para un nivel de confianza del 95% muestra que no existen diferencias significativas entre las varianzas de ambos métodos.

II.3.2.- EXTRACCIÓN DE HAPS CONTENIDOS EN UN MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO

II.3.2.1.- *Análisis por HPLC*

La metodología desarrollada en los apartados anteriores, para la extracción de HAPs contenidos en sedimentos contaminados, se ha aplicado a un sedimento marino con una composición certificada. En estos casos, una limitación importante puede ser la cantidad de sedimento a utilizar. Como, por otra parte, las concentraciones de los HAPs en el material de referencia se pueden considerar pequeñas, se ha impuesto la necesidad de sustituir el detector visible-UV por un detector de fluorescencia, para alcanzar límites de cuantificación adecuados cuando se utiliza la determinación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Al emplear el método cromatográfico desarrollado, utilizando una disolución patrón que contiene 15 HAPs y una composición similar a la obtenida después de aplicar la extracción con

POLE, como se ha comentado anteriormente, se obtienen cromatogramas como el representado en la Figura II.13(a). La adecuación del método cromatográfico para la determinación de los HAPs contenidos en el sedimento certificado queda demostrada al observar la Figura II.13(b), en la que se presenta el cromatograma correspondiente a una disolución obtenida tras aplicar extracción asistida por microondas, haciendo uso de POLE como extractante, al sedimento de referencia.

El análisis de los datos obtenidos muestra que, para los distintos HAPs, se obtienen tiempos de retención satisfactorios, con desviaciones estándar relativas que oscilan entre 0.64 y 1.23%. Para la cuantificación de los HAPs se construyen curvas de calibrado basados en la medida del tamaño de los picos cromatográficos como áreas de pico, obteniéndose relaciones lineales con $R^2 > 0.990$. Los parámetros de calidad del método cromatográfico se muestran en la Tabla II.25.

Los límites de detección obtenidos para cada uno de los HAPs analizados, oscilan entre 0.03 ng/mL para el benzo(k)fluoranteno y 1.09 ng/mL para el pireno. Fueron calculados como tres veces la desviación estándar de una señal que se corresponde con una disolución que contiene concentraciones de los HAPs próximas al valor más bajo del rango lineal de cada hidrocarburo. También se evaluó la repetitividad del sistema cromatográfico, obteniéndose desviaciones estándar relativas que oscilan entre 0.20 y 6.14% para los diferentes HAPs.

Para estudiar la influencia del medio micelar en la determinación cromatográfica de los HAPs seleccionados, las diferentes disoluciones patrón fueron preparadas en POLE 0.02 ó 0.10 M, dependiendo del método de extracción utilizado: microondas o ultrasonidos. Todos los compuestos estudiados aparecen completamente separados del surfactante en los cromatogramas obtenidos después de la inyección de los patrones. Como puede observarse en la Figura II.13.(b) en el cromatograma aparece una señal de baja intensidad que afecta a los HAPs más volátiles.

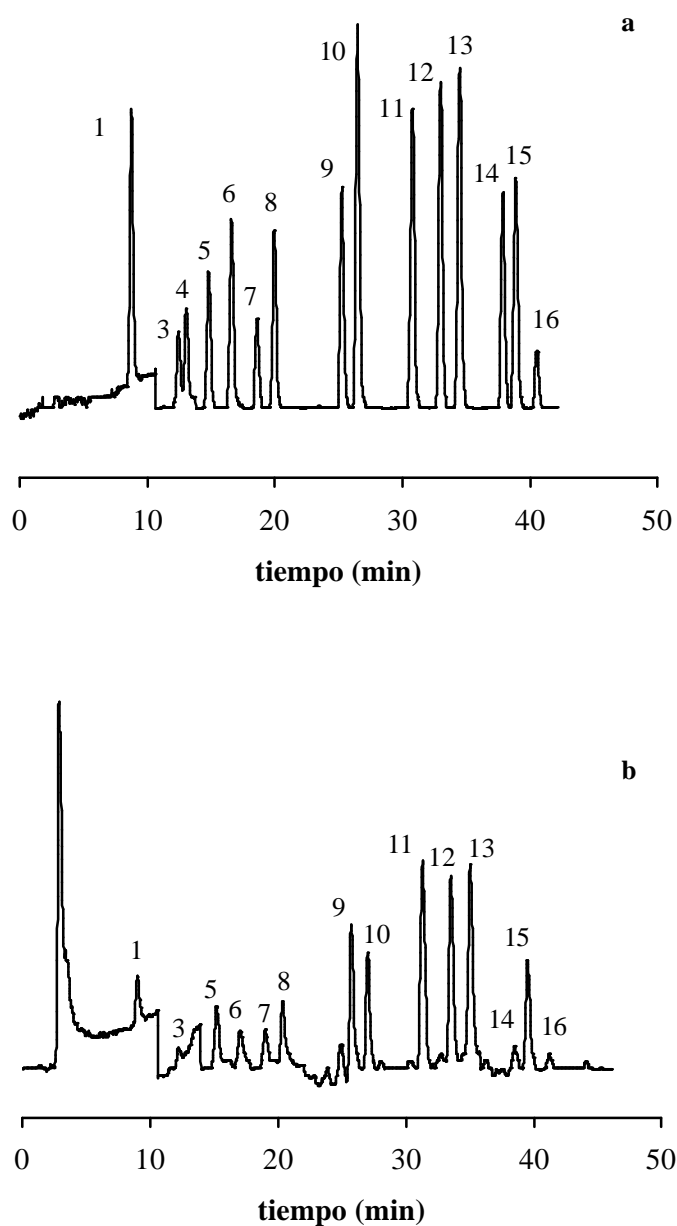


Figura II.13: (a) Cromatograma de una mezcla estándar de HAPs, analizada por HPLC con detección fluorescente. (b) Cromatograma de la disolución obtenida al aplicar al sedimento de referencia una extracción con POLE asistida por microondas en las condiciones descritas.

Tabla II.25.- Parámetros de calidad del método cromatográfico.

HAP	Rango lineal (ng/mL)	Pendiente ± SD	Ord. Origen ± SD	R	S_{Y/X}	LOD (ng/mL)	RSD(%)
N	0.9 - 15	0.861 ± 0.027	0.564 ± 0.224	0.995	0.533	0.36	6.14 (6.5)
Ace	2.0 - 10	0.343 ± 0.010	-0.150 ± 0.060	0.994	0.113	0.83	5.65 (4.5)
Fl	1.3 - 10	0.499 ± 0.009	-0.103 ± 0.054	0.997	0.122	0.62	5.40 (4.5)
Fe	1.0 - 10	0.798 ± 0.021	-0.217 ± 0.119	0.995	0.273	0.49	1.02 (4.0)
A	0.4 - 5.0	2.058 ± 0.027	-0.059 ± 0.074	0.998	0.189	0.15	1.73 (2.5)
Ft	3.5 - 35	0.197 ± 0.002	-0.098 ± 0.044	0.999	0.108	0.66	2.59 (12)
P	2.0 - 35	0.427 ± 0.019	-0.011 ± 0.228	0.996	0.302	1.09	2.64 (12)
B(a)A	0.5 - 5.0	2.548 ± 0.086	0.609 ± 0.215	0.995	0.458	0.22	0.20 (1.6)
Cr	0.4 - 15	1.015 ± 0.032	0.099 ± 0.213	0.995	0.504	0.42	1.73 (7.0)
B(b)Ft	0.6 - 10	1.743 ± 0.029	0.310 ± 0.155	0.998	0.402	0.16	2.20 (4.0)
B(k)Ft	0.3 - 5.0	3.383 ± 0.086	0.119 ± 0.222	0.994	0.594	0.03	1.93 (2.5)
B(a)P	0.3 - 3.0	3.330 ± 0.115	-0.483 ± 0.204	0.994	0.383	0.30	1.68 (2.0)
diB(a,h)	1.4 - 15	0.920 ± 0.025	-0.144 ± 0.156	0.998	0.257	0.80	1.44 (6.5)
B(ghi)Per	1.0 - 10	1.307 ± 0.049	0.108 ± 0.231	0.996	0.358	0.52	4.23 (5.0)
I(1,2,3-cd)P	4.0 - 30	0.179 ± 0.003	-0.106 ± 0.044	0.998	0.092	0.69	4.29 (10)

R: Coeficiente de correlación (n=6). **S_{Y/X}:** Error estándar de la estimación. **LOD:** Límite de detección. Conc. en ppb de los HAPs utilizados para calcular el LOD: 0.7, 0.6, 0.4, 0.5, 0.18, 1.2, 1.8, 0.4, 0.4, 0.5, 0.2, 0.2, 1, 0.6, 1 (respectivamente). **RSD(%):** Desviación estándar relativa para las medidas cromatográficas (n=6). Los valores entre paréntesis en (ng/mL) son las concentraciones utilizadas.

Cuando se utilizan las disoluciones con la concentración de 0.10M de POLE, dicha señal dificulta la cuantificación del fluoreno, aunque este inconveniente no es tal, porque dicho hidrocarburo, de bajo peso molecular, presenta recuperaciones muy bajas, no aconsejándose su determinación por los métodos propuestos. Por otra parte, no se observa ninguna influencia del medio micelar en la intensidad de fluorescencia que presentan los HAPs con un número de anillos superior a tres. Incluso, no se observaron cambios en la eficacia de la columna cromatográfica después de repetidas inyecciones del surfactante.

II.3.2.2.- Extracción de HAPs contenidos en el sedimento SRM 1941a

El sedimento marino certificado (SRM 1941a) ha sido utilizado para validar los dos métodos de extracción que hemos venido comparando. No fue posible utilizar las mismas condiciones optimizadas para los sedimentos contaminados, puesto que ambos sedimentos tienen características diferentes, especialmente en lo que se refiere al contenido en materia orgánica. Es por ello que fue necesario utilizar una menor cantidad del sedimento certificado y, en consecuencia, disminuir la concentración de los HAPs en disolución. Por esta razón se tuvo que realizar una nueva optimización del método de extracción.

Los métodos de extracción propuestos poseen una serie de ventajas, como son los cortos tiempos de extracción, especialmente cuando los comparamos con los correspondientes a los métodos convencionales. Para evaluar la influencia de este parámetro en la eficacia de la extracción, el sedimento de referencia se sometió a la extracción asistida por microondas y por ultrasonidos con POLE.

La Figura II.14 muestra las recuperaciones promedio, incluyendo los intervalos de confianza a un nivel del 95%, como una función del tiempo de extracción. En la extracción asistida por microondas hay un ligero incremento de los porcentajes de recuperación, que no es significativo estadísticamente, cuando pasamos de 5 a 30 minutos. Por otra parte, en la extracción asistida por ultrasonidos, existen aumentos significativos en las recuperaciones cuando pasamos

de 30 a 210 minutos, aunque no sucede lo mismo al seguir aumentando el tiempo de extracción. En atención a lo expuesto, los tiempos de extracción se fijaron en 5 y 210 minutos para la extracción asistida por microondas y por ultrasonidos, respectivamente. Estas conclusiones han sido establecidas con experiencias en las que se utilizaron 100 mg del sedimento certificado. Cuando las cantidades de sedimento se incrementan hasta 200 mg las recuperaciones no experimentaron diferencias significativas.

Como se muestra en la Tabla II.23, el resto de parámetros experimentales optimizados con los sedimentos contaminados, son también adecuados para el sedimento certificado. En general, los resultados que se obtienen ponen de manifiesto que en la extracción asistida por microondas, el tiempo de extracción no es un parámetro crítico, si éste es superior o igual a 5 minutos. Cuando se compara con los tiempos asociados a métodos convencionales, este tiempo de extracción es realmente pequeño. Al utilizar la extracción asistida por ultrasonidos, es necesario encontrar el tiempo óptimo de extracción cuando las características de los sedimentos sean diferentes, especialmente en lo que respecta al contenido en materia orgánica y a la distribución del tamaño de partícula.

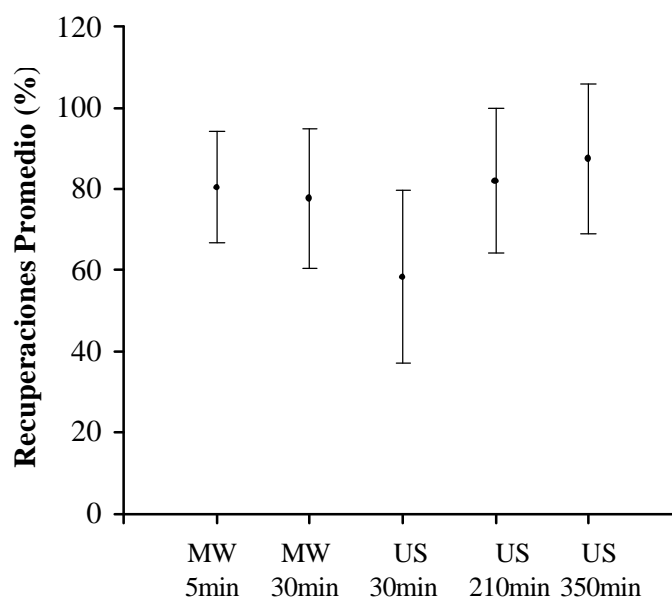


Figura II.14: Recuperaciones promedio de HAPs en función del tiempo total de extracción, utilizando microondas y ultrasonidos.

La Tabla II.26 muestra los valores experimentales obtenidos para las recuperaciones de los HAPs considerados, en las condiciones experimentales establecidas. Para determinar la exactitud y precisión de los métodos, seis porciones de 100 mg del sedimento certificado fue extraído con 10 mL de POLE 0.02 y 0.10 M utilizando microondas y ultrasonidos, respectivamente, y empleando los citados tiempos optimizados de extracción, 5 y 210 minutos. Las recuperaciones de los hidrocarburos más volátiles son prácticamente iguales a cero o muy pequeñas, al igual que sucedía con los sedimentos contaminados. Los HAPs con un número de anillos superior a tres, muestran recuperaciones promedio significativamente más altas con ultrasonidos que con la extracción asistida por microondas. La recuperación promedio obtenida, 86.5% con ultrasonidos, puede considerarse como elevada, aunque es un 10% menor que la que se obtenía con sedimentos contaminados. La precisión obtenida con ambos métodos ha sido estudiada por medio de la desviación estándar relativa. En general, para los hidrocarburos considerados, este parámetro presenta valores similares, o inferiores, a los certificados.

Tabla II.26.- Recuperaciones promedio y porcentajes de RSD para el sedimento marino certificado SRM 1941a, con ambos métodos de extracción de HAPs.

HAPs	Valores certificados (ng/g)	SD ^a (ng/g)	RSD ^b (%)	Extracción por microondas				Extracción ultrasónica			
				Valores	SD ^c	RSD ^d	R	Valores	SD ^c	RSD ^d	R
				hallados (ng/g)	(ng/g)	(%)	(%)	hallados (ng/g)	(ng/g)	(%)	(%)
Ft	981	78	7.9	895	48	5.4	91	819	12	1.5	83
P	811	24	2.9	533	32	6.0	66	683	59	8.6	84
B(a)A	427	25	5.8	244	15	6.4	57	215	18	8.3	50
Cr	380	24	6.3	386	37	9.7	102	381	11	2.8	100
B(b)Ft	740	110	14.9	543	22	4.1	73	591	9.1	1.5	80
B(k)Ft	361	18	4.9	266	19	7.0	74	298	12	4.0	82
B(a)P	628	52	8.3	304	11	3.8	48	462	29	6.3	74
diB(a,h)A	73.9	9.7	13.1	73.0	2.0	3.4	99	85.0	12	14.8	115
B(ghi)Per	525	67	12.8	374	1.1	0.1	71	511	15	3.0	97
I(1,2,3-cd)P	501	72	14.4	465	4.2	0.8	93	501	56	11.3	100
Media						4.7	77.4			6.2	86.5

^a Desviación estándar de los valores certificados. ^b Desviación estándar relativa de los valores certificados.

^c Desviación estándar de los valores experimentales. ^d Desviación estándar relativa de los valores experimentales.

CAPÍTULO III

PRECONCENTRACIÓN DE HAPs MEDIANTE EXTRACCIÓN POR PUNTO NUBE.

III.1.- INTRODUCCIÓN

III.1.1.- EL PUNTO NUBE o CLOUD POINT

Con relación a otras disoluciones acuosas, un rasgo único de las disoluciones formadas por solubilización en agua de surfactantes no iónicos es que, para cada concentración de surfactante, existe un estrecho margen de temperatura, por encima del cual las disoluciones se vuelven turbias, o lo que es lo mismo, se ha alcanzado el “Punto Nube”.

En principio, se admite que dicha turbidez se debe a la formación de agregados del surfactante, de gran tamaño, que dispersan la luz visible que atraviesa la disolución [128]. Por encima de la temperatura del punto nube, se separan dos fases isotrópicas de la disolución micelar. Esta separación de fases es reversible, de manera que mediante una disminución de la temperatura, las dos fases convergen para formar de nuevo una sola fase.

La temperatura a la que se observa el punto nube va a depender principalmente de la concentración de surfactante en la disolución. Por tanto, si representamos gráficamente la temperatura a la que ocurre la separación de fases frente a la concentración de surfactante en disolución, obtenemos un “diagrama de fases” en el que se observa una zona en la que predomina una sola fase (L), y otra en la se observa la existencia de dos fases (2L). La curva que separa estas dos regiones se denomina “curva de codisolución”. Al punto mínimo de esta curva se le conoce como “punto crítico”, y a la temperatura y concentración a las que ocurre se les denomina “temperatura crítica” (T_C) y “concentración crítica” (C_C), respectivamente. Una curva típica de coexistencia, para surfactantes no iónicos, se representa en la Figura III.1. Es importante resaltar que, en zonas de altas concentraciones del surfactante, el diagrama de fases puede llegar a ser mucho más complicado y mostrar zonas de fases anisotrópicas, cristales líquidos, etc.[129,130].

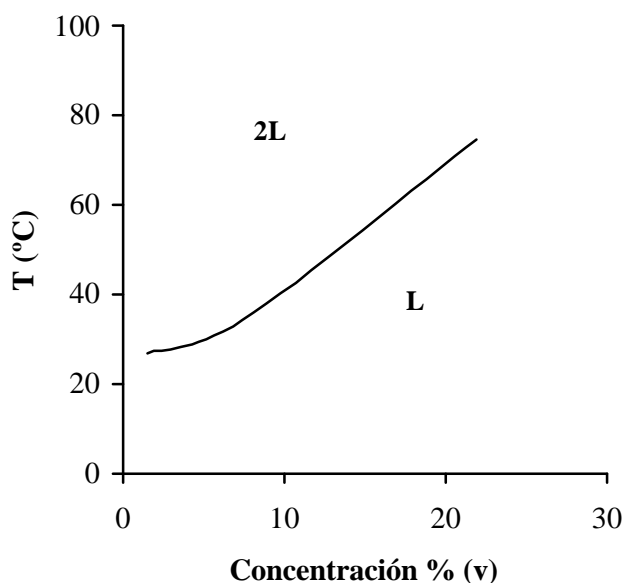


Figura III.1: Diagrama de fases típico de las disoluciones micelares de surfactantes no-iónicos. (L) se refiere a la región de la disolución isotrópica sencilla, mientras que (2L) señala la región de coexistencia de las dos fases isotrópicas.

En distintas referencias bibliográficas se pone de manifiesto que, para un surfactante no iónico, en la región superior de la curva de coexistencia del diagrama de fases no existen micelas, porque las moléculas del surfactante han sido segregadas desde la fase acuosa. No obstante, también se encuentran artículos en los que se señalan evidencias acerca de la existencia de micelas, u otras estructuras de fases: laminares, hexagonales, etc., en las que participa el surfactante, en zonas superiores a las correspondientes a la formación del punto nube [131,132]. En todo caso, no existe acuerdo con respecto a la concentración máxima de surfactante a la que la estructura micelar continúa estando presente, ni tampoco sobre la naturaleza de la estructura microscópica de las disoluciones altamente concentradas en surfactante. Como criterios generales, suele admitirse que, a temperaturas considerablemente superiores a T_C , los aumentos de calor hacen que la fase empobrecida en surfactante se vuelve cada vez más diluida, mientras que la fase enriquecida se vuelve no micelar [129].

El mecanismo por el cual tiene lugar la separación de fases también es poco conocido. Para surfactantes no iónicos, algunos autores han propuesto que, cuando aumenta la temperatura de la disolución, podría producirse un incremento en el número de agregación micelar, con el consiguiente incremento en el tamaño de las micelas [133,134]. Otros sugieren que, para dichos surfactantes, el mecanismo de la separación de las fases puede estar basado en un cambio en las interacciones micelares, las cuales son repulsivas a baja temperatura, pero predominantemente atractivas a altas temperaturas [135]. Cuando se usan surfactantes iónicos, se observa que la presencia de sales favorece la separación de fases, lo cual se ha interpretado como debido a la protección de los efectos electrostáticos repulsivos.

Otros autores atribuyen el fenómeno de punto nube a los procesos de deshidratación que tienen lugar en la capa externa de las micelas de surfactantes no iónicos cuando se incrementa la temperatura [136]. La constante dieléctrica del agua disminuye con el aumento de la temperatura, produciéndose un empeoramiento en la capacidad de solubilización de la parte hidrofílica de la molécula.

Recientemente se han desarrollado modelos teóricos termodinámicos que permiten una predicción exacta de las propiedades de las micelas no iónicas, incluyendo sus curvas de coexistencia para la separación de fases [137-144].

En la Tabla III.1 se encuentra una recopilación resumida de las temperaturas de punto nube para disoluciones acuosas de algunos surfactantes no iónicos, a concentraciones de 1% (p/v), así como el número de agregación y las respectivas concentraciones micelares críticas. Como puede observarse, la temperatura a la cual tiene lugar el fenómeno de separación de fases depende de la estructura del surfactante no iónico. Para una serie homóloga de surfactantes polioxietilados no iónicos, el punto nube aumenta a medida que disminuye la longitud de la cadena hidrocarbonada y al aumentar la longitud de la cadena de oxietileno. Para un contenido constante de oxietileno en la molécula del surfactante, la temperatura del punto de nube disminuye si también lo hace la masa molecular del surfactante, cuando se ramifica el grupo hidrofóbico o si se reemplaza el grupo hidroxilo terminal del grupo hidrófilo por un grupo metilo.

Tabla III.1.- Temperatura de punto nube de varios surfactantes no iónicos para un porcentaje de surfactante del 1% (p/v).

Surfactante	cmc (mM)*	N*	Punto Nube (°C)**
Tipo alquilpolioxietilen-glicol-monoéteres: CH ₃ -(CH ₂) _{n-1} O(C ₂ H ₄ O) _m H, C _n E _m (E = oxietileno)			
C ₈ E ₃	5.6-7.8	-	8
C ₈ E ₄	6.5-8.5	82-147	40
C ₈ E ₅	6.0-9.2	80-130	60
C ₁₀ E ₅	0.69-0.90	-	45
C ₁₂ E ₃	0.052-0.058	-	0
C ₁₂ E ₄ (Brij-30)	0.023-0.064	40	2
C ₁₂ E ₅	0.045-0.065	160	31
C ₁₂ E ₁₀	0.09	-	77
C ₁₂ E ₂₃ (Brij 35)	0.060-0.1000	40	>100
Otros			
Polioxietilen-7.5-nonilfeniléter (PONPE 7.5)	0.085	-	1
Polioxietilen-9.5-octilfeniléter (Triton X-100)	0.21-0.25	43-140	64
Polioxietilen-7.5-octilfeniléter (Triton X-114)	0.20-0.35	-	25
Sorbitol monooleato (Tween 80)	0.0100-0.0145	58	93

*Referencia 145

**Referencia 146

Es importante resaltar que el punto nube de un determinado surfactante no iónico puede ser modificado, aumentado o disminuido, por la presencia o adición de otros materiales: alcoholes, otros aditivos orgánicos, etc., como puede observarse de los datos presentes en la Tabla III.2, en la que se encuentran las temperaturas de punto nube de disoluciones de Triton X-100 a las que se han añadido concentraciones variables de distintas sustancias.

La presencia de aditivos en las disoluciones de surfactantes, provoca efectos de distinto tipo en la temperatura a la que se alcanza el punto nube. Así, en general, la presencia de electrolitos como cloruros, sulfatos, carbonatos, etc., suele originar una disminución de dicha temperatura proporcional a la concentración del electrolito, siendo el efecto producido por una sal determinada, dependiente del radio hidratado de los iones [146-153]. La adición de compuestos constituidos por pequeñas cadenas hidrocarbonadas saturadas, no suele originar disminuciones importantes en la temperatura del punto nube, mientras que la presencia de compuestos orgánicos aún menos polares y que pueden ser solubilizados en el interior de la micela, suele originar aumentos en la temperatura del punto nube.

La presencia en las disoluciones de productos procedentes de la desnaturalización de proteínas, tales como urea o derivados suyos sustituidos, también provoca aumentos en el punto nube [154,155]. Los compuestos orgánicos polares, tales como alcoholes alifáticos, ácidos grasos o fenoles [156-158], suelen originar disminuciones importantes en la temperatura a la que se alcanza el punto nube [159]. Por último, existen datos en la bibliografía consultada que ponen de manifiesto cómo al incrementar la presión se producen ligeros aumentos de la temperatura del punto nube, en disoluciones acuosas de surfactantes no iónicos [160,161].

El punto nube de disoluciones diluidas de surfactantes no iónicos se incrementa con la adición de surfactantes iónicos [131,162-167]. Por otra parte, cuando una disolución contiene dos surfactantes no iónicos diferentes, se observa que la temperatura de punto nube de la disolución resultante es intermedia entre las correspondientes a las disoluciones de los surfactantes no iónicos puros implicados.

Tabla III.2.- Efecto de la adición de diferentes sustancias en la temperatura del punto nube de disoluciones del surfactante no iónico Triton X-100.

Surfactante	Aditivo	Punto Nube (°C)
Triton X-100	0.25 % (p/v)	64
“	7.0 % (p/v)	65
“	33 % (p/v)	76
“	Urea 0.30 <i>M</i>	65.7
“	Urea 0.50 <i>M</i>	68.1
“	1,1-dietilurea 0.30 <i>M</i>	78.4
“	1,1-dietilurea 0.50 <i>M</i>	87.2
“	Cloruro sódico 0.50 <i>M</i>	56
“	Cloruro sódico 1.00 <i>M</i>	47
“	0.29 mM NPE ₈ + 48 mM KCl	40

En atención a lo expuesto, podría ser posible obtener una determinada temperatura de punto nube, para una aplicación analítica concreta, haciendo uso de esta metodología de extracción y/o preconcentración, mediante una adecuada selección de los surfactantes no iónicos formadores de micelas y de los aditivos apropiados.

El fenómeno de punto nube no es exclusivo de los surfactantes no iónicos. Algunos surfactantes zwiteriónicos también presentan este fenómeno y, en consecuencia, también han sido utilizados en esquemas de extracción y preconcentración [168]. A diferencia de lo que sucede con los surfactantes no iónicos, las separaciones de fase de las disoluciones acuosas de casi todos los sistemas micelares de zwiteriones, están inducidas por una disminución de la temperatura. Es decir, los sistemas constituidos por este tipo de surfactantes exhiben su fase de disolución isotrópica (L) a altas temperaturas y, a medida que se provoca un enfriamiento por debajo de la temperatura crítica (T_C), se produce la separación de las fases [169-171]. Junto a este comportamiento general, se han descrito algunas excepciones notables, como son las correspondientes a los surfactantes zwiteriónicos dodecil(dimetil)amonio-dodecil(metil)fosfina ($C_{12}N_{10}PPh$) y óxido de dodecil(metil)fosfina ($DC_{12}PO$), cuyas disoluciones, monofásicas a temperatura ambiente, se vuelven turbias y se separan en dos fases [172,173] a medida que la temperatura va aumentando, comportándose de forma similar a la descrita para la formación del punto nube con surfactantes no iónicos. Como regla general, puede afirmarse que los efectos de la mayoría de los aditivos examinados hasta la fecha, con respecto a la temperatura crítica de las disoluciones de surfactantes zwiteriónicos, son justamente opuestos a los que se han descrito para las disoluciones de surfactantes no iónicos.

Recientemente, se ha mostrado que, a temperatura ambiente, surfactantes aniónicos como el dodecilsulfato sódico (LSS), el hidrógeno-dodecanosulfonato de sodio (SDSA) y el di-octil-sulfosuccinato de sodio (aerosol T), forman dos fases en presencia de altas concentraciones de HCl [174].

III.1.2.- EXTRACCIÓN DE SOLUTOS MEDIANTE LA METODOLOGÍA DE “PUNTO NUBE”

III.1.2.1.- Bases experimentales para la separación de fases

La base de la técnica de extracción que hace uso de la formación de dos fases diferenciadas, mediante la utilización de medios micelares, es decir, provocando el alcanzar el punto nube, reside en el ya conocido fenómeno de fases exhibido por algunas disoluciones micelares de surfactantes. Como se ha comentado con anterioridad, el fenómeno tiene lugar cuando se producen determinadas alteraciones en las características de la disolución acuosa de un surfactante, como cambios en la temperatura o en la presión, adición de sales o cualquier otro aditivo, etc. Como consecuencia, se produce la separación o el fraccionamiento de la disolución acuosa del surfactante en:

- Una fase concentrada que contiene la mayoría del surfactante, denominada “fase rica en surfactante”, y
- Una fase acuosa diluida con una baja concentración de surfactante, próxima a la concentración micelar crítica (cmc).

De esta manera, cualquier soluto presente en la disolución original, que se encuentre asociado a los agregados micelares, puede ser extraído y concentrado en el pequeño volumen de la fase rica en surfactante. Esta metodología, desarrollada inicialmente por Watanabe [175], se conoce como Cloud Point Extraction (CPE) o Extracción por Punto Nube (EPN).

Los pasos usualmente implicados en el proceso de extracción basado en la separación de fases con la mediación de micelas, son los siguientes:

- Adición de surfactante a una disolución acuosa que contiene los componentes a ser extraídos o preconcentrados, permitiendo que se produzca la interacción entre los citados analitos y las micelas.

-A continuación se alteran las condiciones experimentales, generalmente provocando una modificación en la temperatura de la disolución, adicionando electrolitos o, incluso, otros surfactantes, para conseguir que a partir de la disolución micelar se separen las fases rica en el surfactante y diluida. La separación de fases se ve favorecida por la diferencia de densidad entre las fases, y tiene lugar por simple decantación por acción de la gravedad. Para acelerar la separación de las fases se puede recurrir a la centrifugación. La fase rica en el surfactante, conteniendo los componentes extraídos, puede someterse posteriormente a pasos de fraccionamiento y cuantificación si se desea.

Con la finalidad expuesta, la cantidad de surfactante añadida debe ser tal que asegure la formación de agregados micelares en disolución, es decir la concentración final del surfactante debe ser superior a su concentración micelar crítica. Dado que las cmc de los surfactantes no iónicos son bastantes bajas, sólo hay que añadir una pequeña cantidad del surfactante puro, o una pequeña alícuota de una disolución concentrada de surfactante a la disolución que contiene la muestra a analizar.

Las especies que se asocian y enlazan en la disolución a las micelas, pueden ser posteriormente extraídas, con mayor o menor eficacia, dependiendo de la fortaleza de la interacción soluto-micela.

En la Figura III.2 se muestra una representación de las principales etapas implicadas en la separación de fases y la extracción por punto nube de un analito. En el esquema se pone de manifiesto cómo al calentar la disolución de un surfactante no iónico, por encima de la denominada temperatura de punto nube, la disolución micelar se vuelve turbia y tras cierto tiempo, que puede acelerarse por centrifugación, se separan dos fases: la fase rica en el surfactante, que dependiendo de su densidad será la capa superior o la inferior, y la fase acuosa. Por encima de la cmc del surfactante se forman micelas (representadas por círculos) que pueden enlazarse a los analitos. Tras la separación de las fases, por haberse alcanzado el punto nube, los analitos se concentrarán en la fase rica en el surfactante.

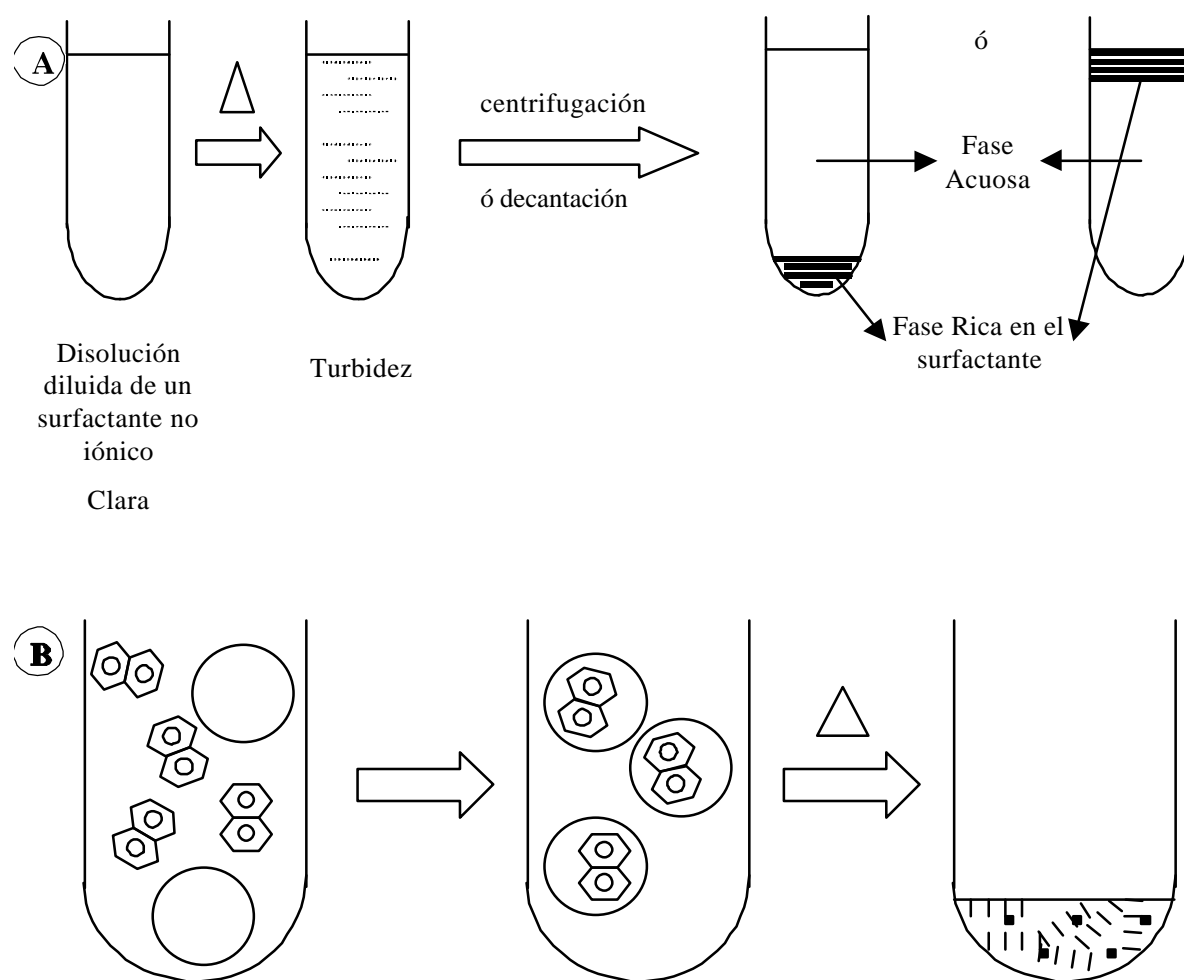


Figura III.2: Representación esquemática de la formación y separación de fases (A) y de la extracción de analitos (B).

III.1.2.2.- Aplicación de la metodología de punto nube a la extracción y preconcentración de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

La metodología de punto nube se ha utilizado para diseñar métodos de extracción eficientes destinados a la separación, preconcentración o purificación de una gran variedad de analitos, incluyendo iones metálicos y un importante número de compuestos orgánicos.

Las ventajas que presenta esta metodología, frente a las convencionales, basadas en la utilización de disolventes inmiscibles, pueden resumirse en:

- Aumentos de selectividad. A esta propiedad contribuyen los surfactantes, ya que los medios micelares pueden resultar muy selectivos en cuanto a los analitos que pueden quedar retenidos en su interior.
- Elevados factores de preconcentración. Esta característica se encuentra favorecida por los reducidos volúmenes de fase rica en surfactante en que quedan retenidos los analitos, que originalmente se encuentran en un volumen de disolución acuosa mucho mayor.
- Mayor seguridad en el trabajo y menores costes. Con la metodología de punto nube, sólo son necesarios volúmenes pequeños de surfactante, frente a los grandes volúmenes de disolventes orgánicos que suelen requerir las metodologías convencionales. Por otra parte, los surfactantes son francamente menos tóxicos que los disolventes orgánicos habitualmente utilizados en la extracción líquido-líquido convencional.
- Compatibilidad de la fase rica en surfactante, que se obtiene tras el proceso de extracción por punto nube, con las fase móviles, micelares o acuo-orgánicas, generalmente empleadas en cromatografía líquida de alta eficacia.

La técnica de punto nube ha sido usada con éxito para la preconcentración de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), como paso previo a su determinación por HPLC. En la Tabla III.3 se muestran algunas de las aplicaciones más destacadas, en la determinación de estos compuestos en diferentes matrices, haciendo uso de la metodología de punto nube.

Tabla III.3.- Aplicaciones de la metodología de punto nube como paso previo a la separación y determinación de HAPs por HPLC.

Matriz	Surfactante	LOD	Comentarios	Ref.
Agua	1.0% SDSA, 4.2 M HCl		Recuperaciones del 99.3% para pireno a 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	174
Carbón	5% C ₉ APSO ₄			168
Lodo	1.0% SDSA, 4.2 M HCl		Análisis de un material de referencia certificado	174
Agua	Genapol X80, 2.0% NaCl	2.6-6.8 ng·L ⁻¹	Recuperaciones > 90%	62
Agua	0.1% Triton X-114	0.002-0.120 ng·mL ⁻¹		178
Cenizas de madera	0.5% Triton X-114		Determinados 6 HAPs a niveles de 3-30 ng·mL ⁻¹	178
Partículas de humo	0.5% Triton X-114, sin CPE		Determinados 7 HAPs a niveles de 9-120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	178
Agua	1.0% Triton X-114	0.30-11.7 ng·L ⁻¹	Aplicado a agua de río	64
Suero humano	2.0% Triton X-100, 4.5 M NaCl		Recuperaciones > 70% a niveles de 120-180 ng·mL ⁻¹	179
Agua	0.1% SDSA, 5 M HCl	0.1-7.9 ng·L ⁻¹	Aplicado a aguas de río y subterráneas	181

Una de las mayores limitaciones de esta metodología es la alta absorbancia mostrada por muchos surfactantes en la región UV que, incluso, puede llegar a impedir su utilización como paso previo a la determinación por HPLC con detección UV, a menos que la fase móvil empleada contenga un alto contenido en metanol, en cuyo caso, la elución del surfactante tiene lugar a un tiempo muy corto y no dificulta la detección de los analitos [176,177]. Una posible forma de superar esta dificultad consiste en utilizar surfactantes que no absorban a las longitudes de onda empleadas en la medida analítica [168]. Otra vía para superar esta desventaja consiste en hacer uso de la detección fluorescente [62,64,178].

Ferrer y col. [64] proponen la separación del surfactante y los HAPs, antes de inyectar la disolución en el sistema cromatográfico, introduciendo un paso de *clean-up* en columna con gel de sílice; eluyéndose luego los HAPs con una mezcla de ciclohexano-diclorometano (80/20, v/v), mientras que el Triton X-114, surfactante no iónico empleado, queda retenido en la columna.

En la determinación de HAPs con Triton X-114, utilizando detección fluorimétrica, García-Pinto y col. [178] describen que la interferencia del surfactante puede eliminarse por dilución de la fase rica en surfactante, que contiene a los HAPs, con una cantidad adecuada de disolvente orgánico, antes de su inyección en el sistema cromatográfico.

Los diferentes tipos de comportamiento encontrados por Ferrer y col. [64] y por García-Pinto y col. [178], parecen estar relacionados con la distinta forma en que se fracciona el surfactante, en función del medio de inyección, del tipo de columna cromatográfica empleada y de la fase móvil usada. Así, una fase rica en el surfactante Triton X-114 no origina señal fluorimétrica cuando se inyecta en una columna Spheri-5-ODS. Sin embargo, cuando se usa una columna Vydac 210 TP5415, el surfactante ocasiona una serie de señales que interfieren en la detección de algunos HAPs.

Surfactantes aniónicos tales como LSS, SDSA y Aerosol OT han sido propuestos por Sicilia y col. [174,181] para la preconcentración de HAPs. Estos surfactantes no originan ninguna señal espectrofotométrica o fluorimétrica a los tiempos de retención de los analitos, aunque cabe destacar que los tiempos requeridos para la separación de fases llegan a ser relativamente largos.

Una ventaja adicional de los procedimientos basados en surfactantes, para la extracción y preconcentración de estos analitos en muestras de agua, es que el uso de la extracción por punto nube, tanto con surfactantes iónicos como no-iónicos, evita la adsorción de HAPs en las paredes de los recipientes que contienen la muestra, cuando en la toma y conservación de la misma se utilizan los surfactantes como aditivos [174,178,180,181]. Además, también es posible la recuperación de HAPs que fueron adsorbidos en los recipientes, cuando las muestras, que fueron almacenadas sin la adición de conservantes, son tratadas posteriormente con surfactantes aniónicos [181]. De igual forma, se ha demostrado que la presencia de altos contenidos de materia orgánica, disueltos en las muestras de agua, no ejerce efecto perjudicial alguno en las recuperaciones de HAPs [174,178].

También se ha descrito la determinación de HAPs en muestras con una complejidad superior a la que presentan las matrices acuosas. Sirimanne y col. [179] han llevado a cabo la extracción de HAPs de suero humano usando Triton X-100 y análisis por HPLC con detección UV. La fase rica en surfactante contiene proteínas que interfieren en la separación en HPLC, al generar un precipitado con la fase móvil. Para evitar este inconveniente, la fase rica en surfactante se trata con acetonitrilo para precipitar las proteínas, inyectándose a continuación el filtrado en el cromatógrafo.

La extracción y preconcentración de HAPs de muestras sólidas también ha sido descrita, empleando surfactantes zwitteriónicos [168], no iónicos [178] y aniónicos [174]. Haciendo uso del sulfato de 3-[nonildimetilamonio]propilo se ha observado que el surfactante es capaz de extraer antraceno de muestras de carbón [168]. La extracción de fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno y benzo(ghi)perileno, contenidos en muestras de partículas de humo y de ceniza de madera, ha sido propuesta y utilizada con éxito, usando Triton X-114 como extractante [178]. En muestras de partículas de humo, el extracto obtenido después de 5 h de extracción con disolución de Triton X-114 al 0.5%, puede inyectarse directamente en el cromatógrafo. En muestras de ceniza de madera, es necesario llevar a cabo un paso de preconcentración por punto nube.

Los valores de recuperación obtenidos en el análisis de un material de referencia certificado (CRM 088) que contiene ocho HAPs certificados, con los surfactantes LSS y SDSA, muestra que la metodología de CPE es perfectamente válida para la extracción de HAPs [168].

III.1.3.- OBJETO DEL TRABAJO

Como se ha comentado anteriormente, uno de los problemas derivados de la utilización de surfactantes en procesos de extracción, utilizando la metodología de punto nube, se relaciona con las características de estos compuestos en cuanto a su capacidad para absorber radiación UV y, sobre todo, para emitir fluorescencia. En nuestro laboratorio, hemos puesto de manifiesto, con trabajos de espectrofluorimetría sincrónica [182] que, en tal sentido, el surfactante Polioxietileno-10-lauriléter (POLE) presenta ventajas considerables frente a otros surfactantes no iónicos.

En base a lo expuesto, al plantearnos la utilización de la metodología de punto nube para la extracción y preconcentración de HAPs contenidos en diversas matrices, fijamos, como primer objetivo, el estudiar el empleo de POLE como alternativa a los surfactantes utilizados por otros autores. En consecuencia, la primera parte de este Capítulo se ha dedicado a establecer las principales características asociadas a la obtención del punto nube con POLE, incluyendo la optimización del proceso de separación de fases y estableciendo la influencia de la fuerza iónica y de la presencia de modificadores orgánicos.

En los siguientes apartados del Capítulo se aplica la metodología establecida a la preconcentración de HAPs contenidos en muestras de sedimentos marinos. En una primera etapa, coincidente con las descritas en el Capítulo II, los HAPs son extraídos de los sedimentos con el empleo de POLE y de técnicas de microondas o de ultrasonidos. En las disoluciones así obtenidas, la formación del punto nube puede permitir una considerable concentración de los HAPs, en la fase rica en surfactante, de forma que se podría conseguir importantes aumentos de sensibilidad.

Por último, se procede a establecer las condiciones para la extracción de HAPs en muestras de agua de mar, con el empleo de la metodología del punto nube, utilizando POLE como surfactante. Con esta matriz, una diferencia importante con respecto a las muestras de sedimentos, es el elevado contenido salino de las disoluciones que, según hemos comentado, puede ocasionar alteraciones importantes en el punto nube. En consecuencia, será necesario proceder a establecer unas condiciones experimentales específicas para la utilización de la citada metodología con este tipo de muestra.

En otro orden de cosas, el carácter hidrofóbico de los HAPs justifica las pequeñas concentraciones en que suelen encontrarse en las muestras de agua de mar. La combinación de la alta sensibilidad que puede alcanzarse con el uso de un detector de fluorescencia y el efecto de preconcentración que se logra con la extracción con punto nube, puede permitir determinaciones de HAPs por HPLC con límites de cuantificación del orden de las partes por trillón.

III.2.- PARTE EXPERIMENTAL

III.2.1.- REACTIVOS

La mayoría de los reactivos empleados en este capítulo, así como la preparación de sus respectivas disoluciones, han sido descritos en II.2.1.

Los disolventes orgánicos empleados en el estudio de la estabilidad del POLE: acetona, acetonitrilo y etanol, han sido suministrados por Merck, de calidad pro análisis.

Para las determinaciones en Cromatografía de Gases, se ha utilizado una disolución patrón, la HAP Mix 64 (Dr. Ehrenstorfer, Reference Materials, Augsburgo, Alemania), que contiene los dieciséis hidrocarburos priorizados por la EPA, a una concentración de 2000 mg/L en cada uno de ellos, disueltos en diclorometano:benceno (1:1).

III.2.1.1.- *Agua de mar artificial*

Su preparación [183] se ha realizado por disolución en agua destilada de las cantidades que se indican a continuación para los siguientes compuestos (Merck, pro análisis):

NaF	3 mg	MgCl ₂ ·6H ₂ O	10.780 g
KBr	100 mg	NaHCO ₃	200 mg
Na ₂ SO ₄	4.000 g	H ₃ BO ₃	30 mg
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	20 mg	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.470 g
SrCl ₂ ·H ₂ O	20 mg	NaCl	23.500 g
KCl	3 mg		

y posterior enrase, en matraz aforado, a 1 L.

III.2.2.- EQUIPOS

III.2.2.1.- *Sistemas de extracción*

Los equipos de microondas y de ultrasonidos, empleados para la extracción de los HAPs contenidos en sedimentos marinos, fueron descritos en II.2.2.

III.2.2.2.- *Control de temperatura*

Los estudios relacionados con la temperatura de formación del punto nube se han efectuado con el empleo de un baño de agua termostatzado: Comfort CB 8-30 de Heto. Las medidas de temperatura se realizaron con un termómetro Crison 638 Pt, calibrado.

III.2.2.3.- *Cromatógrafo líquido de alta resolución*

El equipo de HPLC utilizado es el mismo que se encuentra descrito en II.2.2.

III.2.2.4.- *Cromatógrafo de gases con detección por espectrometría de masas*

La validación de la metodología propuesta para la determinación de los HAPs, se ha realizado con un CG-MS (Varian 3800-Varian Saturn 2000) equipado con una columna WCOT CP-SIL-8 CB de 30 m x 0.25 mm de diámetro interno (Chrompack, Holanda). El equipo incorpora un muestreador automático Varian modelo 8200 CX. Para la adquisición de los datos

se hizo uso del software Saturn CG-MS Workstation 5.3.

III.2.3.- METODOLOGÍAS

III.2.3.1.- *Estudios relacionados con la formación del punto nube*

- Determinación de la temperatura de punto nube y diagrama de fases del POLE

En un tubo de ensayo de 70 mm de longitud y 7 mm de diámetro interno, se introducen 2 mL de la disolución de POLE a estudiar. El tubo se mantiene sujeto en el interior de un baño termostático en el que la temperatura se modifica a unos 1.8 °C/min. La temperatura de punto nube se establece cuando en el seno de la disolución se observa la aparición de turbidez persistente, es decir, que no desaparece al agitar la disolución.

El diagrama de fases del POLE se construye por medida de las temperaturas de punto nube obtenidas para disoluciones con distintas concentraciones de surfactante. Los resultados que se presentan corresponden al valor medio de tres medidas independientes.

- Determinación de la relación de volúmenes

La relación de volúmenes de la fase acuosa con respecto a la fase rica en el surfactante, bajo diferentes condiciones experimentales, se determinó colocando 3 mL de la disolución del surfactante en un tubo de ensayo similar al empleado en el apartado anterior, y provocando a continuación la formación del punto nube. Después de la separación de fases, se midió el volumen de cada fase con una microjeringa Hamilton. Los resultados que se muestran corresponden al valor medio de tres determinaciones independientes.

- Preconcentración de HAPs por punto de nube

Disoluciones de HAPs en POLE al 3.10% (p/v), se mantienen en un baño termostático, a temperatura fija de 95 °C, durante 90 minutos. Transcurrido ese tiempo se extrae la fase rica en el surfactante por medio de una microjeringa Hamilton.

III.2.3.2.- *Determinación de HAPs presentes en sedimentos marinos*

- Contaminación del sedimento marino

Se realiza de la forma descrita en II.2.3.1.

- Extracción asistida por ultrasonidos y preconcentración de HAPs

A 800 mg del sedimento, previamente contaminado con cantidades conocidas de HAPs, se le añaden 10 mL de una disolución de POLE al 6.26% (p/v) y se somete a extracción durante 30 minutos en un baño de ultrasonidos de potencia fija, como se ha descrito en el capítulo anterior. A continuación, se filtra el extracto a través de un filtro de membrana de 0.45 µm (HV Durapore® , Millipore). 5 mL del extracto se diluyen con agua Milli-Q para obtener 10 ml de disolución que contiene un porcentaje de 3.10% en el surfactante. Por último, 3 mL de la disolución resultante se someten a preconcentración por punto nube siguiendo el procedimiento que se acaba de describir.

- Extracción asistida por microondas y preconcentración de HAPs

A 800 mg del sedimento, previamente contaminado con cantidades conocidas de HAPs, se le añaden 10 mL de una disolución de POLE al 1.25% (p/v). El vaso de extracción se cierra y se introduce en la cavidad del horno de microondas. La extracción se lleva a cabo utilizando una potencia de 378 W, durante 5 minutos, manteniendo una presión máxima de 2.03 bares en el interior del reactor. Transcurrido dicho tiempo, se enfrían los vasos a temperatura ambiente,

antes de abrirlos. A continuación, la suspensión se filtra a través de un filtro de membrana de 0.45 μm (HV Durapore® , Millipore). Se toman 5 mL del extracto y se diluyen con POLE al 5.00% para obtener 10 mL de disolución con una concentración total de 3.10 % en el surfactante. Con 3 mL de la disolución resultante se procede a la preconcentración por punto nube, como se ha descrito en párrafos anteriores.

- Análisis cromatográfico

El análisis de las disoluciones de HAPs en presencia de POLE, se realiza por HPLC y detección espectrofotométrica a 254 nm, como se ha descrito II.2.4.

III.2.3.3.- *Determinación de HAPs presentes en agua de mar*

- Contaminación del agua de mar

A 2.0 L de agua de mar natural, en un recipiente de vidrio color topacio, se añade una cantidad suficiente de un fuel-oil comercial, de forma que después de agitar durante una hora, a temperatura ambiente, siga apareciendo una capa de combustible, sin disolver, en la superficie del agua. La muestra se deja en reposo durante una noche, se separa la fase acuosa y se toman dos porciones que se destinan al análisis por HPLC tras su extracción-preconcentración por punto nube, y al análisis por CG-MS como se describe posteriormente.

- Extracción y preconcentración de HAPs

A porciones de agua de mar natural, contaminada como se acaba de indicar, se le añaden cantidades determinadas de POLE para obtener una disolución final al 1% (p/v) en el surfactante. A continuación, alícuotas de 3 mL se someten a extracción y preconcentración por punto nube. Las disoluciones resultantes se destinan a análisis por HPLC como se indica a continuación.

- Análisis cromatográfico

La metodología empleada coincide con la descrita en II.2.4, excepto el programa de longitudes de onda de excitación y emisión que se utiliza en el detector fluorescente, que en este caso es el que aparece en la Tabla III.9.

- Validación de la metodología mediante extracción líquido-líquido convencional (ELL) y cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (CG-MS)

Las muestras de agua de mar contaminadas con fuel-oil fueron extraídas como describe el método 3510C de la EPA, utilizando 1 L de agua de mar y 60 mL de ciclohexano. El extracto se concentra a 1 mL en un Turbo Vap (Zymark®) trabajando a 40 °C con un flujo de nitrógeno comprendido entre 0.54 y 1.02 bar. Las fracciones alifáticas y aromáticas se separaron usando una columna cromatográfica con 5 g de Florisil® (Aldrich), previamente activado a 400 °C, como describe el método 3620B de la EPA. Las fracciones alifáticas y aromáticas fueron eluidas con n-hexano y n-hexano:diclorometano, respectivamente. La disolución que contenía los HAPs se sometió a reducción de volumen hasta 1 mL, en Turbo Vap, empleando las condiciones experimentales indicadas anteriormente.

El análisis de los extractos se realiza como se describe en el método 8270C de EPA, mediante CG-MS y con 3,6-dimetilfenantreno como estándar interno.

Las condiciones de operación del CG-MS fueron las siguientes:

Fuente de iones:	Impacto electrónico (70 eV).
Adquisición:	Modo “monitorización del ion seleccionado” SIM
Temp. del “transfer line”:	280 °C.
Temp. del “ion trap manifold”:	65 °C.
Rango de masas barrido:	50 a 300 u.m.a.

Gas portador:	He. Flujo: 0.8 mL/min. Velocidad lineal: 32.4 cm/s.
Inyección:	Modo split/splitless.
Volumen de inyección:	1 μ L.
Programa de temperatura del horno:	2 min a 40 °C, 10 °C/min hasta 280 °C, manteniendo esta temperatura durante 25 min.
Programa de temperatura del inyector:	0.1 min a 40 °C, 200 °C/min hasta 280 °C, manteniendo esta temperatura durante 48 min.

Las determinaciones cuantitativas se llevaron a cabo usando los valores de masa correspondientes a los iones moleculares de los diferentes HAPs (128 a 278).

III.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.3.1.- CARACTERIZACIÓN DEL PUNTO NUBE DEL POLIOXIETILEN-10-LAURILÉTER

III.3.1.1.- *Diagrama de fases*

Como se ha comentado con anterioridad, la visualización de la formación del punto nube, al modificarse la concentración de surfactante en una disolución, suele realizarse mediante la construcción de los llamados “diagramas de fases” que, además de poner de manifiesto la influencia que la modificación de la temperatura puede ejercer en una disolución micelar, también permite definir la zona en la que está presente una única fase y la zona en que coexisten la fase acuosa y la fase enriquecida en el surfactante.

El polioxietilen-10-lauriléter pertenece al grupo de surfactantes no-iónicos polioxietilénicos, es decir, que se caracteriza por presentar una temperatura crítica superior a la temperatura ambiente. Para la obtención del diagrama de fases del POLE se han preparado disoluciones que contienen concentraciones conocidas de surfactante, variando en un intervalo comprendido entre 0.05 y 5% (p/v), que se someten posteriormente a un incremento de temperatura progresivo de 1.8 °C/min. La temperatura a la cual se produce la separación de las fases se considera como aquella en la que se observa enturbiamiento en la disolución y se aprecia la presencia de ambas fases. El diagrama de fases obtenido al representar la temperatura de enturbiamiento frente a la concentración de surfactante en disolución, se muestra en la Figura III.3.

Como se puede observar, la curva de codisolución muestra un aumento considerable de la temperatura para concentraciones de POLE inferiores al 1% (p/v). A porcentajes superiores de surfactante, la temperatura permanece prácticamente constante. La temperatura crítica, por encima de la cual se debe trabajar para obtener la separación de las fases, calculada a partir del punto de corte de las rectas correspondientes a ambos tramos de la curva, resulta ser,

aproximadamente, de 82 °C.

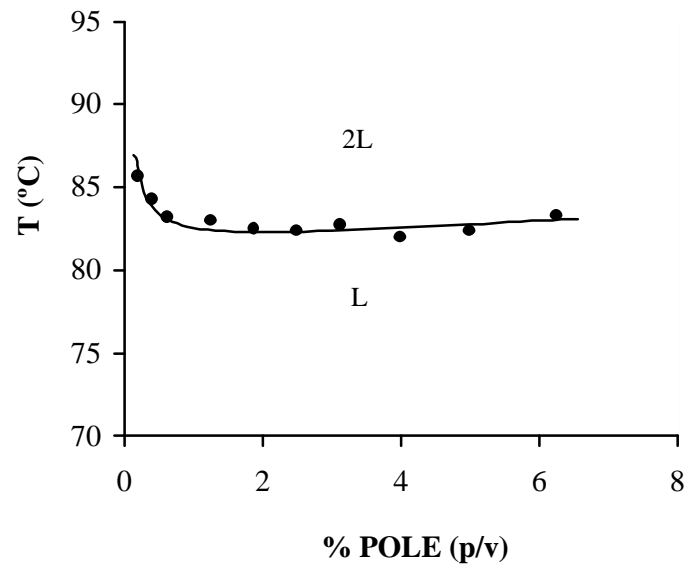


Figura III.3: Curva de coexistencia, medida experimentalmente, para disoluciones acuosas del surfactante no iónico POLE. (L) señala la región de disolución isotrópica simple, (2L) denota la región donde coexisten las dos fases isotrópicas.

III.3.1.2.- Optimización del proceso de separación de fases en la metodología de extracción por punto nube

El grado de distribución del analito entre la fase acuosa y la fase rica en surfactante en la extracción por punto nube, puede describirse por un **coeficiente de distribución K_D** :

$$K_D = \frac{C_S}{C_{ac}}$$

donde C_s es la concentración final de soluto en la fase rica en surfactante y C_{ac} es su concentración en la fase acuosa.

Cuando se utiliza la metodología de punto nube para extraer de forma cuantitativa analitos presentes inicialmente en la fase acuosa, el factor a optimizar es el **factor de extracción (E)**, definido como:

$$E = \frac{n_s}{n_{ac}}$$

siendo n_s el número de moles del analito en la fase rica en surfactante y n_{ac} el número de moles en la fase acuosa.

Al tomar en consideración las ecuaciones anteriores, se obtiene la siguiente expresión:

$$E = K_D \frac{V_s}{V_{ac}}$$

donde V_s/V_{ac} es la razón de volúmenes de las fases. Esto es, el volumen de la fase rica en surfactante, V_s , con respecto al de la fase acuosa, V_{ac} , después de producirse la separación de fases.

Por otra parte, la fracción de **analito extraído, p**, viene dada por,

$$p = \frac{K_D}{K_D + \frac{V_{ac}}{V_s}}$$

expresado en tanto por uno.

Finalmente, el **factor de preconcentración** (C_F) se define como la relación entre la concentración de analito en la fase rica en surfactante con respecto a la que había en la muestra original,

$$C_F = \frac{C_S}{C_{in}} = p \frac{V_{in}}{V_S}$$

donde C_S es la concentración de analito en la fase rica en surfactante, después de la separación de las fases, C_{in} es la concentración de analito en la disolución inicial antes del paso de preconcentración y V_{in} es el volumen de disolución acuosa que va a ser concentrado.

Como puede observarse, el factor de preconcentración depende, entre otros factores, de la relación de los volúmenes de las fases, de la constante de distribución del analito entre las fases y de la concentración de surfactante utilizado.

La relación de fases V_{in}/V_S es la razón entre el volumen de disolución acuosa que va a ser concentrado y el volumen de fase rica en surfactante. Esta razón se incrementa con la disminución en la concentración de surfactante [176].

Para analitos extremadamente hidrofóbicos, que poseen constantes de distribución muy favorables entre la fase acuosa y micelar, el máximo factor de preconcentración que puede alcanzarse, al menos con esta metodología, coincide numéricamente con la relación de fases. La Figura III.4 muestra la variación teórica de C_F en función del porcentaje de Triton X-114, para analitos con diferentes coeficientes de distribución (K_D). Puede observarse que cuando K_D tiende a infinito, C_F coincide con la relación de fases y el factor de preconcentración decrece con la disminución de la constante de distribución [146]. Sin embargo, en algunos casos, se han encontrado factores de preconcentración mayores que la relación de fases, particularmente cuando la señal del analito viene influenciada por la presencia del surfactante.

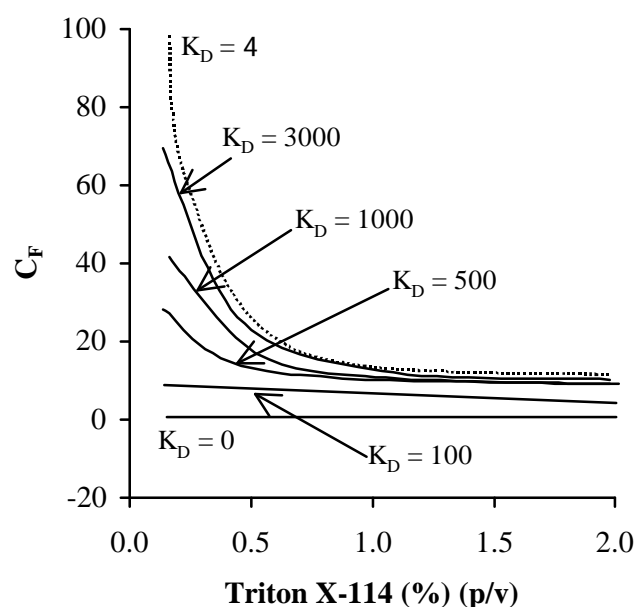


Figura III.4: Variación del factor de preconcentración (C_F) como una función del porcentaje de Triton X-114 para diferentes valores de la constante de distribución (K_D).

En general, el volumen de la fase rica en surfactante que se extrae después de la separación es reducido, lo cual justifica que los factores de preconcentración obtenidos mediante esta técnica sean elevados. El volumen de fase rica en surfactante extraído dependerá de la cantidad de surfactante en disolución y, en consecuencia, de la concentración del mismo. Debido al reducido volumen de la fase rica en surfactante, es necesario establecer un volumen de la misma suficientemente alto como para que su manipulación no conlleve la introducción de errores inadmisibles, y que los resultados sean reproducibles. Por tanto, es necesario optimizar dicho volumen manteniendo al mismo tiempo un factor de preconcentración aceptable. Por otra parte, el establecimiento de un factor de preconcentración nos condicionará la concentración inicial de analito presente en la muestra original para poder ser determinado, teniendo en cuenta la técnica analítica a emplear. De esta forma, el factor de preconcentración que se deba utilizar dependerá en gran medida de la concentración inicial de analito que se quiera determinar.

Los principales factores que van a afectar al volumen de fase rica en surfactante extraído tras el proceso de separación son: la concentración final de surfactante en disolución, el volumen de surfactante añadido, la fuerza iónica del medio y la presencia de modificadores orgánicos en el medio micelar.

- Influencia de la concentración y volumen de surfactante

El factor de preconcentración depende de la concentración del POLE, que a su vez determina el volumen de la fase rica en el surfactante. Para estudiar la influencia de este parámetro se sometieron al proceso de separación de fases una serie de disoluciones de POLE con diferentes concentraciones. Una vez que ha tenido lugar la separación de fases, se mide el volumen de cada una de ellas. Para calcular el factor de preconcentración se determina la relación V_{in}/V_s de los volúmenes obtenidos tras el proceso de punto nube. La Figura III.5a muestra el volumen de la fase rica en el surfactante obtenida, y el correspondiente factor de preconcentración, como función de la concentración de POLE.

Cuando la concentración de la disolución de surfactante varía entre 1 y 5% (p/v), se observa una disminución en el factor de preconcentración. Sin embargo, para concentraciones superiores al 5%, el factor de preconcentración permanece prácticamente constante. Esto muestra que a medida que disminuye la concentración del surfactante, más altos son los factores de preconcentración, pero cuando el volumen de fase rica en surfactante es muy pequeño, el proceso de extracción se vuelve más difícil, y probablemente disminuyan la exactitud y reproducibilidad debido a las dificultades que conlleva la manipulación de volúmenes demasiado pequeños. Para establecer una relación adecuada entre la concentración del surfactante en disolución y la fase rica en el surfactante, se seleccionó una concentración de 3.10% (p/v).

Cuando variamos el volumen total de surfactante empleado, manteniendo constante la concentración final del surfactante, el volumen de la fase rica en surfactante aumenta linealmente a medida que este volumen total se incrementa. La Figura III.5b muestra esta linealidad, para una concentración de POLE de 3.10% (p/v).

Estos resultados permiten diseñar esquemas analíticos, con un factor de preconcentración preseleccionado, en función de la cantidad del analito a determinar, el volumen de muestra disponible, y de la técnica analítica que se vaya a utilizar.

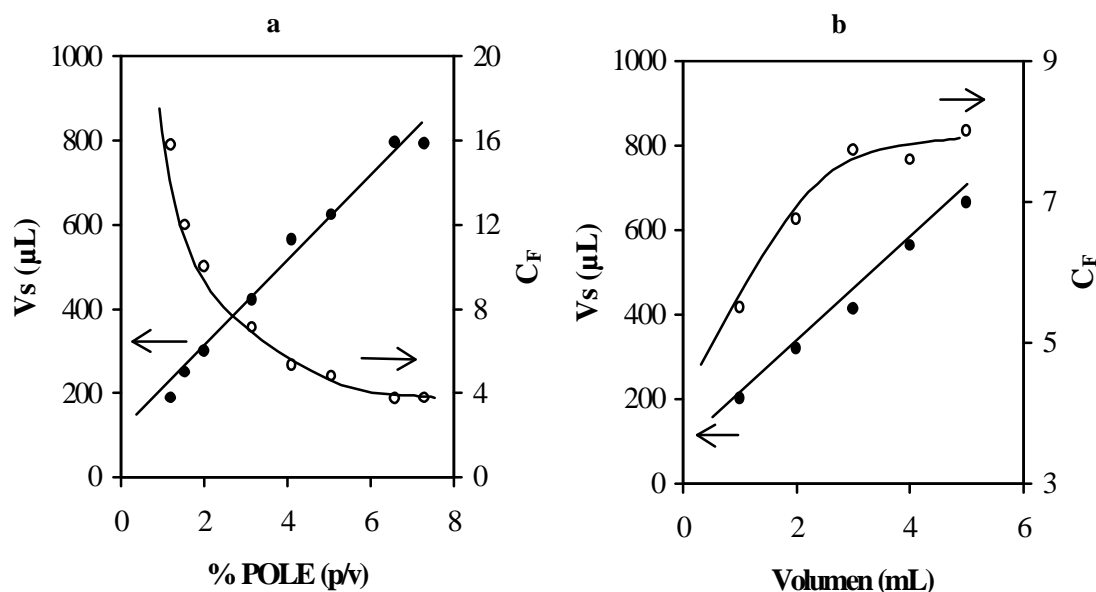


Figura III.5: Volumen de la fase rica en el surfactante y factor de preconcentración en función de: (a) Concentración de POLE y (b) Volumen de POLE para $C_{\text{POLE}} = 3.10\%$ (p/v).

Una vez comprobado el efecto de la concentración de surfactante en disolución sobre la relación de volúmenes entre la fase rica en surfactante y la fase acuosa, y teniendo en cuenta la necesidad de un volumen de la fase rica en surfactante que permita un adecuado manejo de la misma, la concentración de trabajo se ha establecido en el 3.10% (p/v) y el volumen total de surfactante empleado se fija en 3 mL. El volumen de la fase rica en surfactante que se obtiene para estas condiciones experimentales es de 414 μL, que puede considerarse adecuado y permite, además, la obtención de un factor de preconcentración de 7.2.

- Influencia de la Temperatura y Tiempo de equilibrio

Cuando se trabaja con una concentración dada de surfactante, el volumen de la fase rica en el mismo puede disminuir al aumentar temperatura y el tiempo de equilibrio [184]. Este fenómeno puede interpretarse en base a que, a medida que la temperatura aumenta, los enlaces de hidrógeno se rompen y se producen los procesos de deshidratación, Así, cuando la temperatura

aumenta, la cantidad de agua en la fase rica en surfactante decrece y el volumen de dicha fase disminuye.

Para obtener factores de preconcentración elevados, la separación por punto nube debe llevarse a cabo a temperaturas mayores que la temperatura crítica y las fases deben mantenerse a esa temperatura durante un cierto tiempo (tiempo de equilibrio). Considerando que la temperatura crítica del POLE es de 82°C, se eligió una temperatura de equilibrio de 95°C para la extracción por punto nube.

La separación de las fases se realizó por simple decantación. El uso de la centrifugación ayuda a disminuir los tiempos de análisis, pero conlleva dificultades experimentales, como es, en nuestro caso, la necesidad de mantener las temperaturas altas a las que la extracción por punto nube se ha llevado a cabo.

El tiempo de equilibrio, a temperaturas por encima de la temperatura crítica, se optimizó en base al período de tiempo más corto, necesario para la completa separación de las fases. La dependencia del tiempo de equilibrio a 95°C en los porcentajes de recuperación de los HAPs se muestra en la Figura III.6.

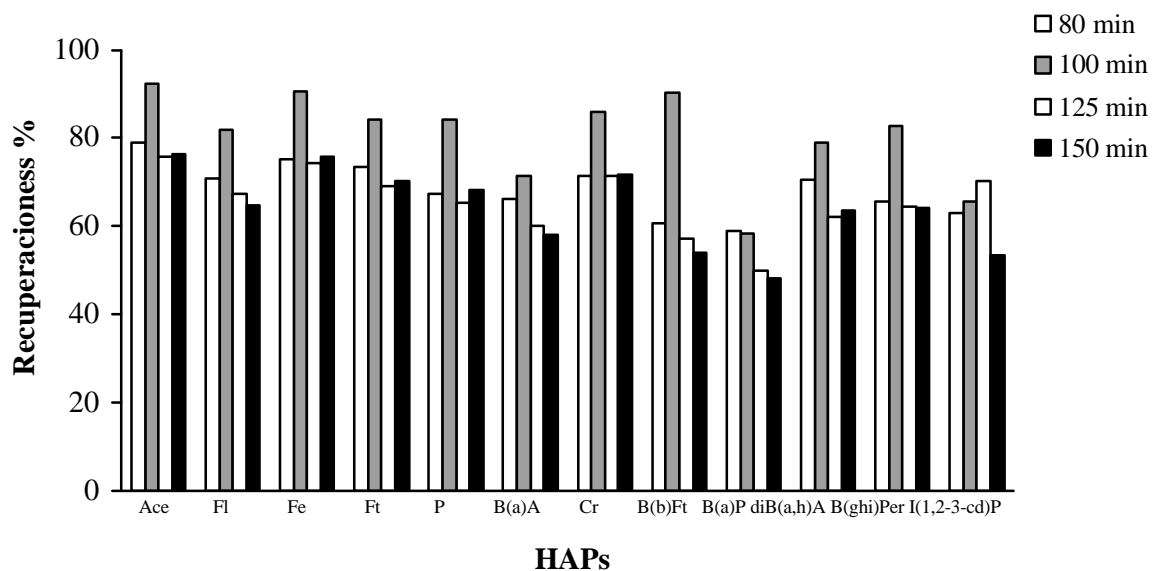


Figura III.6: Influencia del tiempo de equilibrio en los porcentajes de recuperación de HAPs.

En general, todos los HAPs muestran un comportamiento similar. Se encuentra que al incrementar el tiempo de equilibrio de 80 a 100 minutos se producen mejoras en los rendimientos de las recuperaciones, disminuyendo a 125 minutos y permaneciendo prácticamente constantes para tiempos superiores. Se eligió un tiempo de equilibrio de 90 minutos como el más adecuado para los analitos en estudio.

- Influencia de la fuerza iónica del medio

A concentraciones inferiores a 0.01 M la mayoría de los electrolitos no presentan efectos significativos sobre el proceso de extracción por punto nube. Sin embargo, para concentraciones superiores pueden producirse tanto el efecto salino interno, como el efecto salino externo de los surfactantes no iónicos, con lo cual puede tener lugar una disminución o un incremento de la temperatura crítica, respectivamente [185].

Se han propuesto varios mecanismos para explicar los efectos de los electrolitos en la T_C de las disoluciones acuosas de los surfactantes no iónicos [186]. Por ejemplo, algunos electrolitos pueden hacer que disminuya la temperatura crítica por un proceso de deshidratación, mientras que otros provocan descensos en T_C , porque favorecen la asociación entre moléculas de agua.

Para determinar el efecto de los electrolitos en el punto nube de disoluciones de POLE, manteniendo las condiciones experimentales ya establecidas, se utilizaron diferentes electrolitos, observándose que la adición de NaCl, NaNO₃, MgCl₂ y Na₂SO₄ a disoluciones micelares de POLE 0.1 M, provoca descensos en la temperatura de punto nube, como se muestra en la Figura III.7. Entre los resultados más significativos, cabe destacar que la disminución de la temperatura de punto nube es aproximadamente una función lineal de la concentración de electrolito. El efecto en la disminución del punto nube sigue, en orden decreciente, la siguiente secuencia: NaNO₃<NaCl<MgCl₂<Na₂SO₄.

Por otra parte, los resultados obtenidos indican que un incremento en la fuerza iónica no tiene una influencia apreciable en el volumen final de la fase rica en surfactante extraída. También merece destacarse que la adición de estas sales inertes, facilita la separación de las dos fases. Esta observación complementa la descrita en trabajos previos, en los que se ha puesto de

manifiesto que la presencia de sales en disolución hace que se incrementen y estabilicen las fuerzas electrostáticas en la superficie de las micelas. De esta forma, dichas cargas aparecen a concentraciones más reducidas y se produce un aumento en la densidad de la fase acuosa, lo que permite una mejor separación de la fase micelar respecto a la fase acuosa [184].

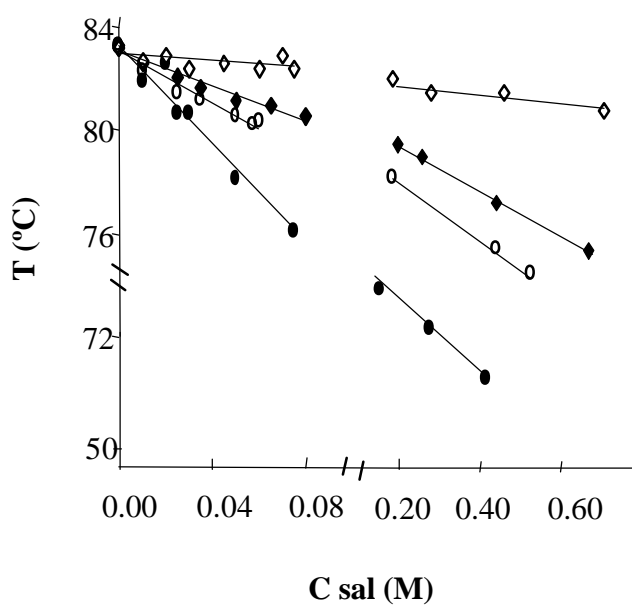


Figura III.7: Temperatura de punto de nube del POLE en función de la concentración salina. (") NaNO_3 , (—) NaCl , (o) MgCl_2 y ($\bar{\bar{Z}}$) Na_2SO_4 .

- Influencia de la presencia de modificadores orgánicos

En trabajos recientes [187,188] se ha puesto de manifiesto que la adición de disolventes orgánicos, como el etanol, a la disolución acuosa del surfactante, con anterioridad a la extracción, permite un incremento en el factor de preconcentración, al tiempo que favorece la cinética de la extracción, disminuyendo el tiempo de equilibrio requerido.

Para determinar el efecto de modificadores orgánicos en el punto nube de disoluciones acuosas de POLE, se probaron disolventes orgánicos como etanol, acetona y acetonitrilo. Se observa que para disoluciones de POLE 0.1 M, la temperatura del punto nube aumenta con el porcentaje de disolvente orgánico, como se muestra en la Figura III.8.

El aumento de la temperatura del punto nube por adición de estos modificadores es prácticamente una función lineal del porcentaje de modificador orgánico, siendo el aumento de temperatura más acusado en el caso del etanol, para el que se producen incrementos de unos 15 °C al variar las concentraciones de modificador, desde un 0% al 7%.

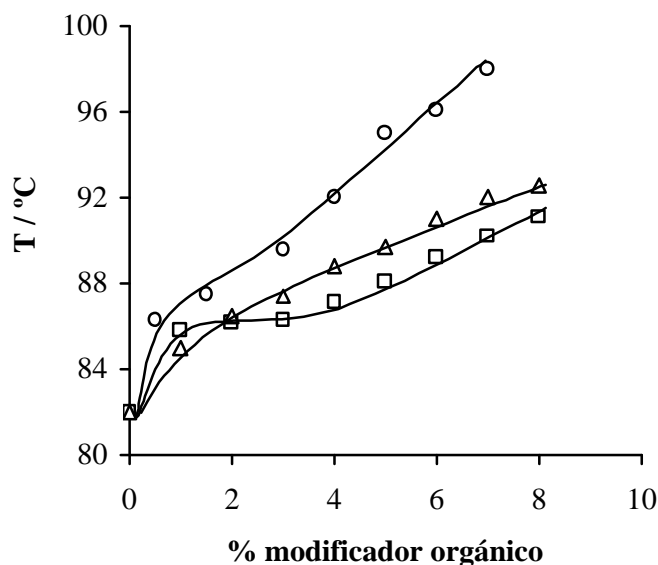


Figura III.8: Influencia de la adición de modificadores orgánicos en la temperatura de punto nube de la disolución de POLE al 3.10%. (●) etanol, (△) acetona y (◻) acetonitrilo.

En atención a que las disoluciones iniciales de los analitos a estudiar en esta Memoria se han preparado en etanol, se llevó a cabo un estudio del efecto de la presencia de este disolvente orgánico en la eficacia de la extracción por punto nube de los HAPs en estudio.

Para porcentajes en etanol de 1.08, 1.73 y 2.50% se observa que, mientras las recuperaciones de los HAPs permanecen prácticamente constantes, los factores de preconcentración aumentan con el porcentaje de etanol. Tal y como se observa en la Tabla III.4, dichos valores han sido calculados teniendo en cuenta el valor de V_s obtenido experimentalmente para cada porcentaje de etanol. El aumento del porcentaje de etanol trae consigo una disminución del volumen de la fase rica de surfactante desde 420 a 280 μL , con lo que el factor de

preconcentración aumenta de 7.1 a 10.7.

Tabla III.4.- Influencia del porcentaje de etanol en las recuperaciones de los HAPs (calculados con Vs experimental).

HAP	Recuperaciones (%)		
	1.08 %	1.73 %	2.50 %
Acenafteno	90.6	82.3	79.6
Fluoreno	81.4	79.9	77.9
Fenantreno	89.4	90.5	92.6
Fluoranteno	80.7	72.3	69.8
Pireno	82.2	77.7	76.8
Benzo(a)antraceno	70.0	68.3	65.5
Criseno	84.9	90.4	93.7
Benzo(b)fluoranteno	90.2	87.6	85.2
Benzo(a)pireno	57.6	58.6	59.0
Dibenzo(a,h)antraceno	78.0	76.7	76.5
Benzo(ghi)perileno	82.5	79.4	76.8
Indeno(1,2,3-cd)pireno	65.2	65.0	64.2
Vs (μ L)	420	347	280
C _F	7.14	8.64	10.7

Sin embargo, los valores de las recuperaciones de HAPs obtenidos, calculados teniendo en cuenta el valor de Vs teórico (esto es, suponiendo que dicho volumen no varía con el porcentaje de etanol añadido), aumentan conforme se incrementa el tanto por ciento de disolvente orgánico. Esto puede observarse claramente en los datos de la Tabla III.5.

Tabla III.5.- Influencia del porcentaje de etanol en las recuperaciones de los HAPs (calculado con Vs teórico).

HAP	Recuperaciones (%)		
	1.08 %	1.73 %	2.50 %
Acenafteno	90.5	102	118
Fluoreno	81.2	93.3	108
Fenantreno	89.1	102	119
Fluoranteno	80.6	94.2	102
Pireno	82.0	95.9	105
Benzo(a)antraceno	69.9	81.8	88.3
Criseno	84.7	109	116
Benzo(b)fluoranteno	90.0	103	115
Benzo(a)pireno	57.5	64.4	68.7
Dibenzo(a,h)antraceno	77.9	93.1	112
Benzo(ghi)perileno	82.3	94.3	108
Indeno(1,2,3-cd)pireno	70.0	73.4	79.8

III.3.2.- PRECONCENTRACIÓN DE HAPs EXTRAÍDOS DE SEDIMENTOS MARINOS

En el capítulo anterior se ha propuesto la extracción de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos que están contenidos en sedimentos marinos, con un medio micelar de polioxietileno-10-lauriléter (POLE) y el empleo de las técnicas de microondas (EAM) y ultrasonidos (EAU). La simplicidad de estos métodos, su rapidez y los altos valores que se obtienen en las recuperaciones de los HAPs con más de tres anillos, muestran que las metodologías propuestas pueden ser alternativas válidas con relación a otras técnicas de extracción convencionales. Como contrapunto negativo, los métodos de análisis de estos hidrocarburos por HPLC, con detección UV, basados en EAM y EAU y el uso de un medio micelar de POLE, presentan límites de detección comprendidos entre 10 y 400 ppb que, en atención a las concentraciones habituales en sedimentos marinos, deben ser considerados como elevados.

Con objeto de mejorar la sensibilidad del método, hemos creído oportuno introducir una etapa de preconcentración de los HAPs previamente extraídos con POLE, siguiendo la metodología de punto nube.

III.3.2.1.- *Determinación de los HAPs. Características analíticas del método*

Antes de proceder a la realización de los estudios relacionados con la preconcentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos, es necesario disponer de un método de análisis apropiado. En atención a la experiencia adquirida en el capítulo anterior, la determinación de los HAPs se ha realizado por HPLC con detección UV. Sin embargo, al introducir ahora una etapa de preconcentración, parece oportuno preparar las curvas de calibrado utilizando disoluciones de patrones sometidos a extracción mediante la técnica de punto nube propuesta.

Esta forma de operar ha sido propuesta [189], junto con otras, como el empleo de las adiciones estándar o la utilización de un patrón interno, con objeto de eliminar errores por efecto matriz, en las medidas realizadas con detectores V-UV o de fluorescencia. Al respecto, se ha

puesto de manifiesto que en la extracción de determinados compuestos orgánicos, como HAPs y PCBs, en muestras enriquecidas artificialmente, al realizar su extracción con técnicas de punto nube se obtienen recuperaciones superiores al 100%. Entre las causas esgrimidas para justificar este hecho experimental, se ha especulado con la alta viscosidad de la fase rica en el surfactante, que dificultaría su manipulación, con los consiguientes errores, y con modificaciones en el microambiente de los analitos, que podrían alterar sus propiedades espectroscópicas.

La Figura III.9. muestra el cromatograma correspondiente a una mezcla de HAPs en POLE, obtenida al someter una disolución patrón de los hidrocarburos a extracción por punto nube, con el empleo de dicho surfactante. Por las razones ya comentadas en el Capítulo II, en relación a las bajas recuperaciones que muestra el naftaleno, este HAP no ha sido incluido en la disolución patrón. Según puede observarse, los restantes hidrocarburos presentan tiempos de retención aceptables, con valores de RSD(%) que oscilan entre 0.54 y 1.11%. Cabe destacar que la presencia del surfactante no origina interferencias, incluso con los HAPs más polares, pues presenta tiempos de retención muy pequeños.

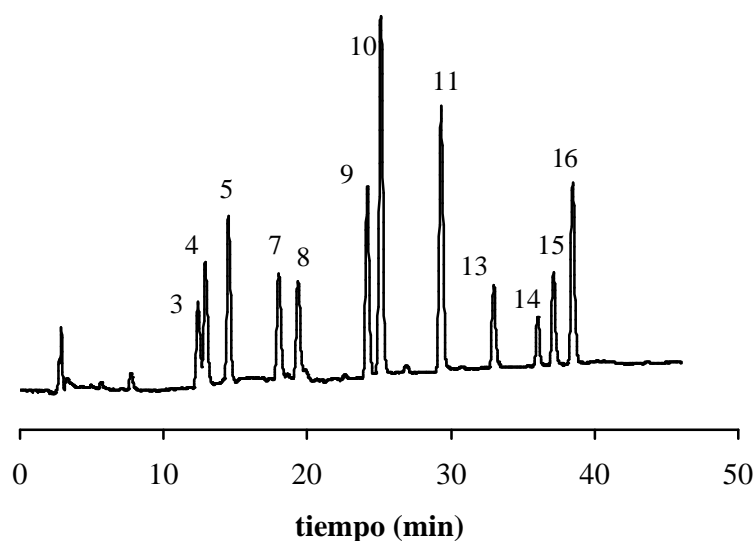


Figura III.9: Cromatograma obtenido para una mezcla estándar de HAPs después de someterse a extracción por punto nube.

En atención a lo expuesto, las curvas de calibrado se han construido con disoluciones patrón de HAPs en POLE, al 3.10%, utilizando un volumen total de 3 mL, y posterior sometimiento a CPE. En estas condiciones se obtiene una relación de fases igual a 7.2.

Es posible conseguir relaciones de fases superiores y, por consiguiente, aumentar la sensibilidad del método de análisis. En tal sentido se ha llegado a una solución de compromiso entre los volúmenes y la concentración de surfactante, por un lado, y los volúmenes mínimos de fase rica en el surfactante que pueden manipularse en la práctica sin cometer errores excesivos.

Para todos los compuestos estudiados, se encontraron relaciones lineales entre las áreas de los respectivos picos cromatográficos y la concentración del analito. Los parámetros analíticos asociados a la metodología establecida, obtenidos a partir de las correspondientes rectas de regresión, se muestran en la Tabla III.6.

Por otra parte, seis muestras con idénticas concentraciones de HAPs fueron sometidas al procedimiento completo de preconcentración por punto de nube y posterior análisis cromatográfico. Las desviaciones estándar relativas que se obtienen para concentraciones intermedias dentro del rango lineal del método, se señalan en la Tabla III.7. Con fines comparativos, en dicha Tabla se incluyen los límites de detección de cada uno de los HAPs, tanto los obtenidos en disoluciones que no se someten a extracción por punto nube como en disoluciones sometidas a dicho procedimiento. La relación entre ambos límites oscila entre 2 y 15, excepto para el benzo(a)pireno, que presenta valores similares en ambos casos.

Tabla III.6.- Parámetros estadísticos de las rectas de calibración del método analítico propuesto (CPE-HPLC).

HAP	Rango lineal (ppb)	Pendiente \pm SD	Ord. Origen \pm SD	R	$S_{y/x}$
Acenafteno	79.5 - 596	5.84 ± 0.32	-0.14 ± 0.12	0.99	0.170
Fluoreno	17.1 - 128	41.6 ± 2.15	-0.29 ± 0.17	0.99	0.243
Fenantreno	7.50 -56.2	141 ± 9.16	-0.47 ± 0.32	0.98	0.454
Fluoranteno	20.2 - 152	37.7 ± 2.81	-0.54 ± 0.26	0.98	0.376
Pireno	18.0 -135	34.8 ± 1.97	-0.19 ± 0.16	0.99	0.233
Benzo(a)antraceno	19.1 - 143	64.6 ± 3.82	-0.79 ± 0.34	0.99	0.481
Criseno	19.1 - 143	129.2 ± 10.1	-0.73 ± 0.89	0.98	1.276
Benzo(b)fluoranteno	22.0 -165	80.2 ± 4.65	-0.62 ± 0.47	0.99	0.676
Benzo(a)pireno	22.9 - 172	25.1 ± 1.54	-0.41 ± 0.16	0.99	0.226
Dibenzo(a,h)antraceno	14.5 - 108	19.1 ± 1.57	-0.14 ± 0.10	0.97	0.150
Benzo(ghi)perileno	15.8 - 119	33.9 ± 2.31	-0.06 ± 0.17	0.98	0.235
Indeno(1,2,3-cd)pireno	62.3 - 467	19.9 ± 1.01	-1.03 ± 0.32	0.99	0.377

R: coeficiente de correlación (n=10). $S_{y/x}$: Error estándar de la estimación.

Tabla III.7.- Parámetros de calidad del método de análisis de HAPs después de su preconcentración por punto nube en medio de POLE.

HAP	C _{HAP} (ppb)	RSD (%)	LOD ^a (ppb)	LOD ^b (ppb)
Acenafteno	395	4.43	24.0	133
Fluoreno	85.4	3.42	7.00	34.6
Fenantreno	37.5	9.06	3.50	13.6
Fluoranteno	101	5.66	14.5	26.4
Pireno	89.8	4.52	5.80	9.10
Benzo(a)antraceno	95.5	3.79	12.5	33.8
Criseno	95.3	4.72	5.70	17.7
Benzo(b)fluoranteno	110	3.15	7.80	22.6
Benzo(a)pireno	115	21.0	10.8	10.3
Dibenzo(a,h)antraceno	72.3	11.7	7.90	90.3
Benzo(ghi)perileno	79.3	6.25	2.20	32.8
Indeno(1,2,3-cd)pireno	311	7.19	52.4	134

LOD: Límite de detección calculado como tres veces el ruido de fondo.

^aMuestras tras la preconcentración.

^bMuestras sin preconcentración.

III.3.2.2.- *Determinación de HAPs contenidos en sedimentos marinos. Aplicación de la metodología de punto nube*

Para evaluar la utilidad de la metodología del punto de nube en la preconcentración y posterior determinación por HPLC de los HAPs estudiados, el método propuesto se aplicó a la determinación de estos compuestos en muestras de sedimentos marinos tomados en puntos representativos de las islas de Tenerife y La Palma. Estos sedimentos fueron contaminados previamente, de acuerdo con el procedimiento experimental descrito.

La Figura III.10a muestra el cromatograma de la fase rica en el surfactante obtenida tras la preconcentración de HAPs por punto nube, después de su extracción asistida por ultrasonidos con un medio micelar de POLE, mientras que en la Figura III.10b se ha incluido el correspondiente a la extracción asistida por microondas seguida de preconcentración por punto nube. En ambos casos se pone de manifiesto que las separaciones obtenidas son excelentes para los HAPs con más de tres anillos.

Por otra parte, en la Tabla III.8 se han agrupado los resultados correspondientes a las recuperaciones medias obtenidas para tres determinaciones independientes de HAPs por HPLC, después de su extracción por EAM o EAU y preconcentración por medio del punto nube utilizando POLE como surfactante.

Los cuatro primeros HAPs, entre los 16 que constituyen la lista priorizada por la Agencia de Protección del medio Ambiente (EPA), muestran recuperaciones próximas a cero en el paso de extracción simple con el medio micelar de POLE y el empleo de técnicas de microondas o ultrasonidos. Una explicación podría residir en la pérdidas por volatilización de estos HAPs en el proceso de contaminación del sedimento, o en las diferentes interacciones de los hidrocarburos con componentes orgánicos o inorgánicos presentes en los sedimentos, que podrían afectar a su solubilidad o difusividad en el medio micelar.

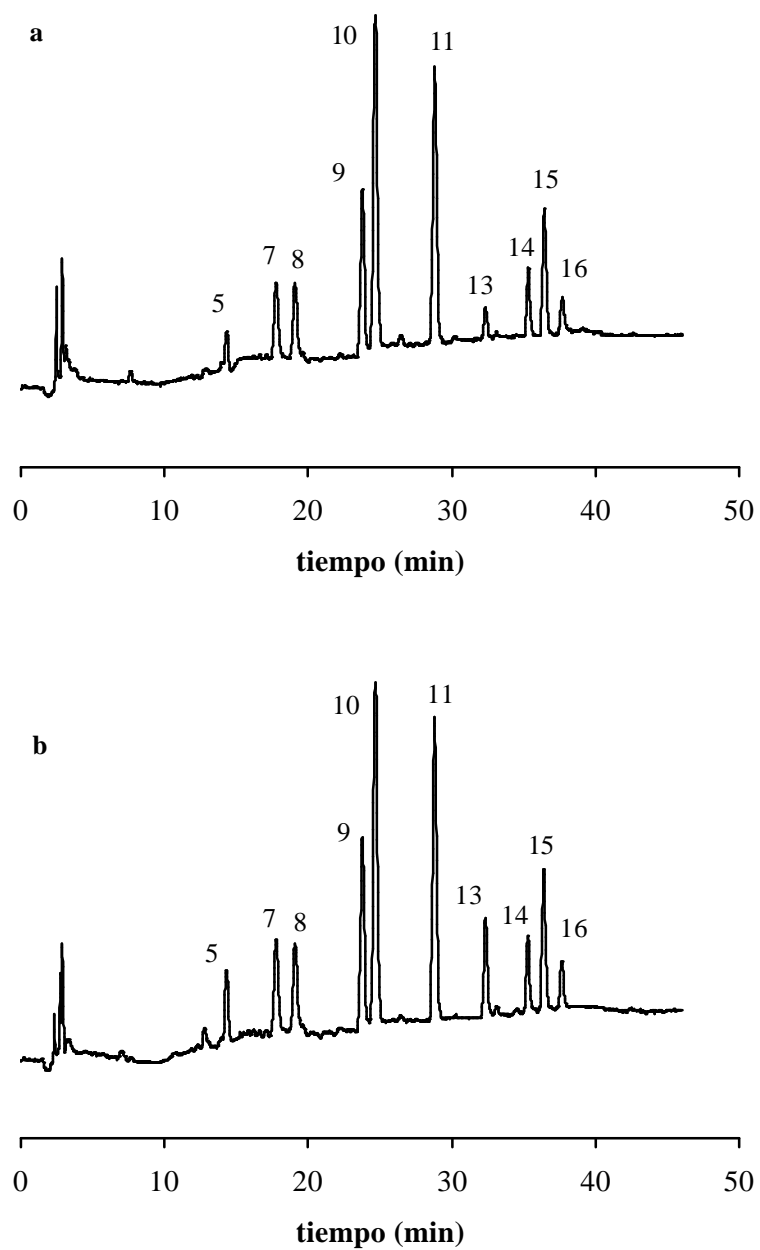


Figura III.10: Cromatogramas de disoluciones de HAPs obtenidas a partir de sedimentos marinos, mediante extracción con POLE asistida por ultrasonidos (**a**) o por microondas (**b**) y preconcentración por punto nube.

En cambio, los HAPs con más de tres anillos, excepto en el caso del benzo(a)pireno, muestran recuperaciones superiores al 88%. Con el uso de la metodología aquí desarrollada, las recuperaciones medias obtenidas tras los procesos de extracción y preconcentración fueron de 98.8%, cuando se utilizó la técnica por microondas, y de 106.8% cuando se empleó la técnica de ultrasonidos. Aunque en ambos casos las eficacias de extracción son similares, la precisión, expresada como la media de las desviaciones estándar relativas, es considerablemente mayor cuando se emplea la técnica por ultrasonidos, 3.8%, que cuando la extracción es asistida por microondas, 15.1%.

Tabla III.8.- Recuperaciones de HAPs de sedimentos marinos, después de la extracción por microondas o ultrasonidos, y posterior preconcentración por punto nube.

HAP	Añadido (ppb)	Extracción asistida por microondas		Extracción asistida por ultrasonidos	
		Hallado ^a (ppb)	Recuperación (%)	Hallado ^a (ppb)	Recuperación (%)
Fe	10	11.6 ± 0.1	116.2 ± 15.7	8.8 ± 0.6	88.1 ± 6.2
Ft	60	65.6 ± 8.6	109.3 ± 14.3	60.2 ± 1.9	100.4 ± 3.2
P	60	56.5 ± 7.2	94.2 ± 12.0	55.5 ± 0.9	92.6 ± 1.6
B(a)A	60	69.8 ± 7.3	116.3 ± 12.2	70.8 ± 3.2	118.0 ± 5.3
Cr	60	61.2 ± 10.8	102.1 ± 18.0	63.5 ± 1.2	105.8 ± 1.9
B(b)Ft	70	78.7 ± 7.3	112.5 ± 10.4	81.8 ± 2.1	116.9 ± 3.0
B(a)P	70	65.7 ± 15.8	93.8 ± 22.6	40.2 ± 2.3	57.5 ± 3.2
diB(a,h)A	70	75.8 ± 15.6	108.2 ± 22.3	71.4 ± 0.7	102.0 ± 1.0
B(ghi)Per	70	76.0 ± 12.7	108.6 ± 18.2	72.3 ± 3.0	103.3 ± 4.2
I(1,2,3-cd)P	70	75.3 ± 3.9	107.6 ± 5.6	69.4 ± 6.2	99.1 ± 8.9

^aMedia de tres determinaciones independientes

III.3.3.- EXTRACCIÓN DE HAPs DE AGUA DE MAR

Con anterioridad se ha puesto de manifiesto que la metodología de punto nube resulta eficaz para la preconcentración de HAPs, previamente extraídos de muestras de sedimentos marinos, con el empleo de disoluciones micelares de POLE.

En este apartado se pretende extender la aplicación de dicha metodología a la extracción y preconcentración de HAPs presentes en muestras de agua de mar, un medio considerablemente diferente al estudiado en el apartado anterior, y en el que la concentración de hidrocarburos suele ser muy pequeña, como corresponde con el carácter hidrofóbico de los mismos.

III.3.3.1.- *El punto de nube en matrices de agua de mar*

Al estudiar la formación del punto nube en disoluciones acuosas, se puso de manifiesto que un aumento en la fuerza iónica de la disolución provocaba una disminución en la temperatura de formación del punto nube, sin que se modificara de modo apreciable el volumen final de la fase rica en el surfactante. Los estudios realizados con distintos electrolitos, en concentraciones que llegaban a 0.6 M, también mostraban que la separación de fases mejoraba con el aumento en la concentración de las sales añadidas. Otro aspecto importante reside en que al provocar la formación del punto nube en dichas disoluciones, la fase rica en el surfactante, de mayor densidad, ocupa la parte inferior para concentraciones, dependientes del electrolito estudiado, en general no superiores a 0.02 M.

En las experiencias encaminadas a alcanzar el punto nube con POLE como surfactante, haciendo uso de una matriz de agua de mar artificial, se observa que la fase rica en el surfactante ocupa ahora la capa superior. Este cambio en el orden de densidad de las fases supone una ventaja considerable, desde el punto de vista analítico, ya que se minimiza la posibilidad de contaminación por cruce de componentes entre las fases, además de facilitar la separación física de las fases o la toma de muestra para el análisis.

Ante la situación que se comenta, significativamente diferente a la que se plantea en apartados anteriores, hemos creído oportuno profundizar, aunque sea de un modo somero, en la caracterización del punto nube del POLE en un medio constituido por agua de mar artificial que, como se ha expuesto, provoca cambios importantes en sus propiedades.

- Temperatura crítica y diagrama de fases

Para la obtención del diagrama de fases se han preparado diferentes disoluciones de POLE en agua de mar sintética, con concentraciones del surfactante que varían entre 0.5 y 6.0% (p/v). En cada una de ellas se incrementa la temperatura a razón de 1.8 °C/min. El diagrama de fases obtenido al representar la temperatura de enturbiamiento frente a la concentración del surfactante se muestra en la Figura III.11.

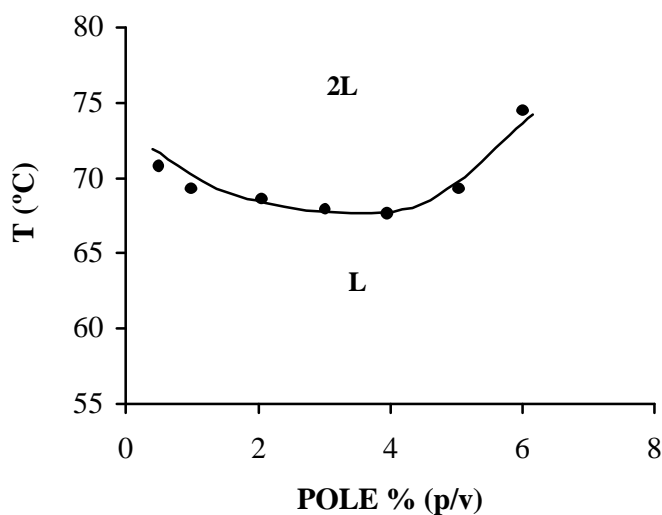


Figura III.11: Diagrama de fases del POLE en agua de mar sintética.

La curva de codisolución que se obtiene muestra un mínimo a 67.5 °C para una concentración del surfactante del 4% (p/v). Al comparar los resultados obtenidos con los

correspondientes a medios acuosos convencionales, las temperaturas de punto nube obtenidas para el POLE, en agua de mar sintética, son unos 14 °C inferiores.

En atención a los datos experimentales que se han obtenido, para alcanzar las máximas recuperaciones de los HAPs y con objeto de facilitar en lo posible la formación del punto nube, sin pérdida de fiabilidad, se eligió como temperatura de punto nube 95 °C y como tiempo de equilibrio 90 minutos, tal y como se describió en el apartado de *influencia de la temperatura y tiempo de equilibrio* (dentro de la sección III.3.1.2.). Una vez alcanzadas estas condiciones, ya se había logrado una adecuada separación de fases en la decantación por gravedad a esa temperatura.

- Factor de preconcentración

Como se ha comentado, el factor de preconcentración es uno de los parámetros de mayor interés en los estudios relacionados con la formación del punto nube. Para estudiar la influencia de la concentración de POLE en el factor de concentración, se sometieron una serie de disoluciones del surfactante en agua de mar sintética al proceso de separación de fases por punto nube. La Figura III.12 muestra el volumen obtenido de fase rica en el surfactante, y el consiguiente factor de preconcentración, como una función de la concentración de POLE. En general, se observa una disminución del factor de preconcentración cuando la concentración de surfactante varía entre 0.5 y el 4.0% (p/v). Sin embargo, esta disminución es mucho menor para concentraciones superiores al 2.0% (p/v).

Teniendo en cuenta los resultados señalados en la figura, se estableció en un 1% (p/v) la concentración de POLE a emplear, obteniéndose así un factor de preconcentración de 17.6 y un volumen de fase rica en surfactante de 170 µL. Este volumen es fácilmente extraíble con una microjeringa y permite la realización de varias inyecciones en el sistema cromatográfico.

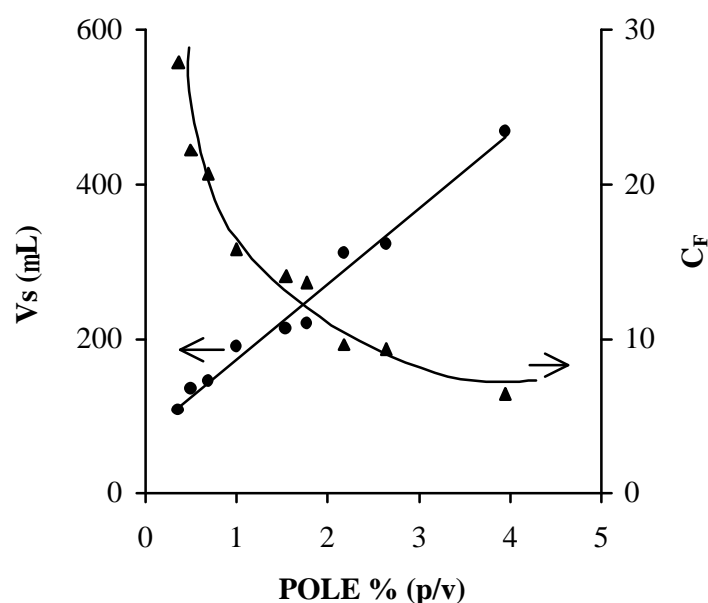


Figura III.12: Volumen de fase rica en el surfactante y factor de preconcentración, en función de la concentración de POLE disuelto en agua de mar sintética.

III.3.3.2.- *Análisis cromatográfico*

Las bajas concentraciones a la que los HAPs suelen encontrarse en el agua de mar requieren del empleo de métodos de análisis con elevada sensibilidad. Con tal finalidad y en atención a los resultados comentados en apartados anteriores, se ha establecido un método de análisis para la determinación de HAPs por HPLC, con las ventajas que suponen la preconcentración por punto nube y la detección fluorescente.

Con relación al empleo de dicho sistema de detección, en el apartado II.2.4 se ha descrito su utilización para cuantificar los HAPs presentes en disoluciones con un 1.25% y un 6.26% (p/v) de POLE. Aunque en los cromatogramas aparece una señal a tiempos de retención similares a los correspondientes al par acenafteno-fluoreno, su intensidad no era suficientemente grande como para impedir la determinación de dichos hidrocarburos.

En las condiciones resultantes de la separación por punto nube, las concentraciones de POLE en la fase rica en el surfactante son muy elevadas, de manera que originan señales cromatográficas que impiden la cuantificación del acenafteno y del fluoreno, cuando se utiliza detección fluorescente. Con objeto de eliminar, o al menos minimizar, la interferencia causada por el surfactante, sin que se produzcan pérdidas importantes de sensibilidad, se ensayaron distintos pares de longitudes de onda de excitación y emisión para los hidrocarburos citados, tratando de lograr que desapareciera la señal del surfactante pero no así la de los dos HAPs. En la Tabla III.9 se muestra el programa de longitudes de onda que ha conducido a los mejores resultados. No nos ha sido posible alcanzar todos los objetivos enunciados, de modo que en atención a las escasas recuperaciones que nuestro método presenta para el acenafteno, hemos optado por no cuantificarlo en las muestras a analizar, priorizando de esta manera la determinación del fluoreno. La detección fluorescente, utilizando las longitudes de onda de excitación y emisión del fluoreno, evita la interferencia por parte del surfactante.

La Figura III.13 muestra el cromatograma obtenido de una mezcla estándar de HAPs en las condiciones experimentales descritas. Los diferentes hidrocarburos presentan tiempos de retención satisfactorios, con desviaciones estándar relativas que oscilan entre 0.62 y 0.83%. Al tomar en consideración los aspectos cuantitativos del método, se encontró que, entre el área de pico y la concentración de analito para todos los compuestos estudiados, existían relaciones lineales. Los parámetros estadísticos, obtenidos a partir de los correspondientes ajustes lineales, se muestran en la Tabla III.10.

Tabla III.9.- Programa de longitudes de onda del detector de fluorescencia usado para la determinación de HAPs en agua de mar por HPLC .

Tiempo (min)	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Compuesto	t_{retención} (min)
0	222	329	1. N	8.72
10.7	260	332	4. Fl	13.1
13.9	248	370	5. Fe	14.9
			6. A	16.7
17.7	275	419	7. Ft	18.7
			8. P	20.0
22.1	273	384	9. B(a)A	25.3
			10. Cr	26.6
28.5	254	451	11. B(b)Ft	30.9
32.2	288	406	12. B(k)Ft	33.2
			13. B(a)P	34.7
35.9	289	422	14. diB(a,h)A	38.1
			15. B(ghi)Per	39.1
40.0	297	496	16. I(1,2,3-cd)P	40.8

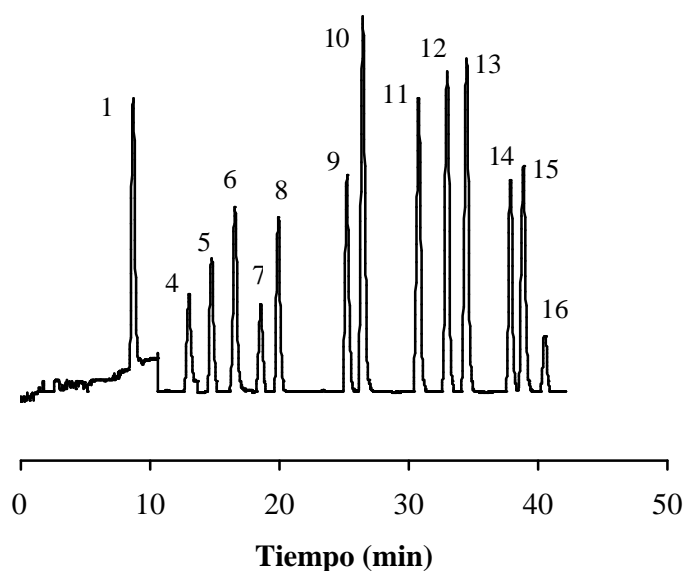


Figura III.13: Cromatograma de una mezcla estándar de HAPs en las condiciones cromatográficas descritas, realizado con la utilización del programa de longitudes de onda incluido en la Tabla III.9.

El procedimiento descrito, se ha aplicado a muestras de agua de mar sintéticas contaminadas con una disolución patrón de HAPs. En la Figura III.14 se ha incluido un cromatograma representativo de la fase rica en surfactante, después del proceso de preconcentración. Cabe destacar el tiempo de retención tan bajo que presenta el surfactante, permitiendo la detección de hidrocarburos como el naftaleno sin interferencia por parte del surfactante. Sin embargo, como habíamos comentado, al tiempo de retención del acenafteno aparece una banda debida al surfactante que dificulta su posible cuantificación.

Tabla III.10.- Parámetros de calidad del método cromatográfico de análisis para la determinación de HAPs por HPLC y detección fluorescente.

HAP	Rango Lineal (mg/L)	Pendiente \pm SD	Ord. Origen \pm SD	R ²	S _{Y/X}
1. N	0.9-15	0.861 \pm 0.027	0.564 \pm 0.224	0.990	0.533
4. Fl	2.0-15	0.899 \pm 0.013	0.041 \pm 0.117	0.998	0.219
5. Fe	1.0-10	0.798 \pm 0.021	-0.217 \pm 0.119	0.991	0.273
6. A	0.4-5.0	2.058 \pm 0.027	-0.059 \pm 0.074	0.997	0.189
7. Ft	3.5-35	0.197 \pm 0.002	-0.098 \pm 0.044	0.998	0.108
8. P	2.0-35	0.427 \pm 0.019	-0.011 \pm 0.228	0.992	0.302
9. B(a)A	0.5-5.0	2.548 \pm 0.086	0.608 \pm 0.215	0.990	0.458
10. Cr	0.4-15	1.015 \pm 0.032	0.099 \pm 0.213	0.990	0.504
11. B(b)Ft	0.6-10	1.743 \pm 0.029	0.310 \pm 0.155	0.996	0.402
12. B(k)Ft	0.3-5.0	3.383 \pm 0.086	0.119 \pm 0.222	0.989	0.594
13. B(a)P	0.3-3.0	3.330 \pm 0.115	-0.483 \pm 0.204	0.989	0.383
14. diB(a,h)A	1.4-15	0.920 \pm 0.025	-0.144 \pm 0.156	0.995	0.257
15. B(ghi)Per	1.0-10	1.307 \pm 0.049	0.108 \pm 0.231	0.993	0.358
16. I(1,2,3-cd)P	4.0-30	0.179 \pm 0.003	-0.106 \pm 0.044	0.997	0.092

R: Coeficiente de correlación (n= 12). **S_{Y/X}:** Error estándar de la estimación.

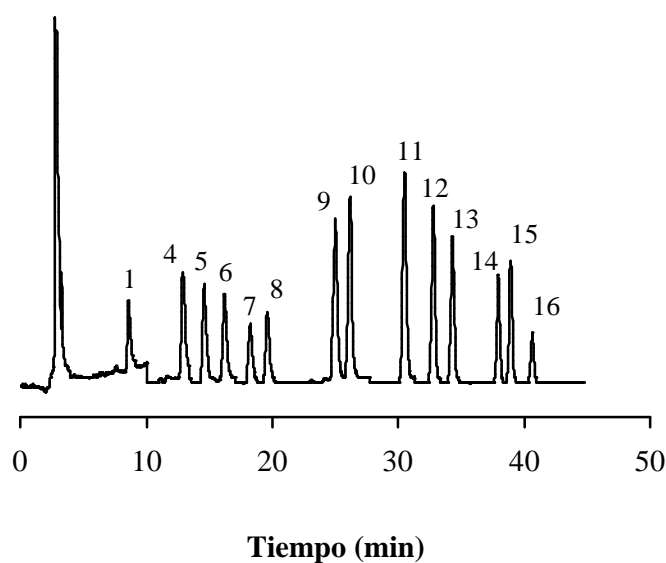


Figura III.14: Cromatograma correspondiente a la fase rica en surfactante procedente de la preconcentración por punto nube de una muestra de agua de mar artificial contaminada con HAPs.

Los límites de detección del método, para cada uno de los hidrocarburos considerados, fueron calculados como tres veces la desviación estándar de la señal correspondiente a una disolución diluida de HAPs a la que se aplicó el procedimiento completo de extracción por punto nube y separación cromatográfica. Como se muestra en la Tabla III.11, los límites de detección oscilan entre 1.0 ng/L para benzo(k)fluoranteno y $1.5 \cdot 10^2$ ng/L para el fenantreno. Estos valores son, en general, unas 20 veces menores que los obtenidos para disoluciones de HAPs no sometidas a preconcentración por punto nube. Al menos desde un punto de vista teórico, estos límites de detección pueden mejorarse considerablemente variando la concentración de surfactante en el paso de preconcentración.

Asimismo, en dicha Tabla se incluyen los resultados del estudio de reproducibilidad del sistema cromatográfico, aplicado a seis muestras de agua de mar artificial a las que se han añadido concentraciones conocidas de HAPs. Dicho estudio se llevó a cabo para una

concentración de cada HAP cercana a su límite de cuantificación, encontrándose desviaciones estándar relativas que oscilan entre 2.91 y 10.4% para los diferentes HAPs.

Tabla III.11.- Desviación estándar y límites de detección de estándares de HAPs en agua de mar, sometidos a extracción por punto nube y posterior separación cromatográfica por HPLC.

HAP	Conc. añadida (ppb)	RSD(%)	LOD (ng/L)
1. N	0.8	4.04	81
4. Fl	0.6	5.03	5.0
5. Fe	0.6	5.24	54
6. A	0.3	5.58	9.0
7. Ft	2.0	2.91	1.5·10 ²
8. P	1.2	7.48	18
9. B(a)A	0.3	5.06	5.0
10. Cr	0.8	8.30	53
11. B(b)Ft	0.6	7.78	14
12. B(k)Ft	0.3	7.08	1.0
13. B(a)P	0.2	7.53	15
14. diB(a,h)A	0.6	10.1	20
15. B(ghi)Per	0.5	10.4	25
16. I(1,2,3-cd)P	1.8	7.69	96

RSD(%): Desviación estándar relativa para las concentraciones señaladas HAPs (n=6) a las que se aplicó el procedimiento completo (preconcentración por punto nube y posterior separación cromatográfica)

LOD: Límite de detección calculado como se describe en el texto.

III.3.3.3.- Efecto de la concentración de analito

Las experiencias anteriores se han realizado para determinadas concentraciones de HAPs. Con objeto de establecer el efecto que la concentración inicial de analito en la disolución podría ejercer en la recuperación de los distintos hidrocarburos, se sometieron al proceso de extracción por punto nube una serie de disoluciones en agua de mar artificial, conteniendo diferentes concentraciones de HAPs. Los resultados indican que los porcentajes de recuperación obtenidos no varían en gran medida cuando la concentración de analito, después de la extracción por punto nube, se encuentra comprendida entre el límite de cuantificación del método y el límite superior del rango lineal de trabajo.

Cuando las concentraciones añadidas de cada HAP se representan frente a las concentraciones obtenidas después de concluir los procesos de preconcentración por punto nube y separación cromatográfica, se obtienen rectas de regresión con $R > 0.91$. La prueba t para $n=7$ a un nivel de confianza del 95% muestra que las pendientes y las ordenadas en el origen no son significativamente diferentes de 1 y 0, respectivamente, para la mayoría de los HAPs salvo el pireno, cuya pendiente difiere significativamente de 1 para el nivel de confianza señalado, según muestran los resultados agrupados en la Tabla III.12. La excepción es el naftaleno, que presenta un error sistemático debido a las pequeñas recuperaciones en la etapa de preconcentración. El error aleatorio para cada HAP, estimado a partir del cálculo de $S_{Y/X}$, oscila entre 0.33 y 4.92.

Los resultados muestran que la metodología desarrollada es aplicable a la determinación de HAPs, con las excepciones comentadas, presentes en muestras de agua de mar. Junto a la gran sensibilidad que se alcanza, imprescindible, por otra parte, para el tipo de muestra considerado, el principal inconveniente puede estar en los tiempos de análisis, especialmente influidos por la necesidad de provocar la formación del punto nube en muestras y patrones. No obstante, las disoluciones utilizadas para la obtención de las curvas de calibrado no necesitan ser sometidas a extracción y preconcentración por punto nube, sino que basta con disolver los HAPs en un medio micelar concentrado o incluso en un disolvente orgánico y pinchar estos estándares directamente, con la consiguiente ganancia de tiempo.

Tabla III.12.- Resultados del test individual de la pendiente y de la ordenada en el origen para cada HAP.

HAP	Ord. Origen			Pendiente			R	S _{y/x}
	a	S _a	t _{exp}	b	S _b	t _{exp}		
1. N	1.401	0.653	3.288	0.472	-5.678	3.458	0.940	0.803
4. Fl	-4.335	3.633	0.328	0.915	0.165	0.560	0.941	4.912
5. Fe	1.091	0.856	1.489	0.700	-3.373	0.612	0.950	1.019
6. A	0.006	0.378	0.045	0.910	-0.045	1.857	0.933	0.458
7. Ft	-1.752	2.814	0.221	0.705	1.647	0.648	0.950	3.364
8. P	0.226	0.946	0.252	1.140	-0.631	2.855	0.973	1.131
9. B(a)A	-0.510	0.508	1.976	1.200	2.656	0.947	0.944	0.605
10. Cr	-0.393	1.419	0.195	0.955	0.732	1.331	0.942	1.702
11. B(b)Ft	0.287	0.460	1.356	0.875	-1.650	0.713	0.990	0.506
12. B(k)Ft	0.118	0.274	1.582	1.188	-1.144	1.050	0.964	0.335
13. B(a)P	0.252	0.331	2.305	0.766	-2.018	1.222	0.939	0.400
14. diB(a,h)A	0.596	0.702	1.212	0.766	-2.249	1.508	0.938	0.852
15. B(ghi)Per	0.539	0.694	1.118	0.824	-2.053	1.234	0.906	0.824
16. I(1,2,3-cd)P	1.380	2.281	0.265	0.915	-1.601	1.126	0.937	2.929

$t_{0.05,7} = 2.57$ al 95%

III.3.3.4.- *Determinación de HAPs en agua de mar*

Para evaluar la eficacia de los procesos de extracción y preconcentración descritos en los apartados anteriores, se llevaron a cabo estudios de recuperación con muestras de agua de mar

natural, a las que se añadieron concentraciones conocidas de HAPs. Los niveles de HAPs añadidos oscilan entre 0.07 - 0.80 ng/mL. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla III.13. Puede observarse que las recuperaciones encontradas son altamente satisfactorias para la mayoría de los HAPs determinados, excepto en el caso del naftaleno, con recuperaciones menores del 40% en ambos casos. Probablemente, una porción de este hidrocarburo puede perderse durante la extracción, debido a la temperatura a la cual se realiza el proceso de extracción y la formación del punto nube.

Con objeto de validar la aplicabilidad de la metodología propuesta para la determinación de HAPs en agua de mar, se contaminaron muestras de agua de mar exentas de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, con un fuel-oil. Estas muestras se analizaron por HPLC después de ser sometidas a extracción y preconcentración por punto nube, así como por un método descrito en la bibliografía, como es la extracción líquido-líquido convencional y posterior detección en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. En la Tabla III.14 se han agrupado algunas características de este método analítico. Las Figuras III.15, a y b, muestran los cromatogramas representativos de ambas metodologías para una misma muestra.

Los resultados agrupados en la Tabla III.15 muestran que, para los hidrocarburos de bajo peso molecular, se obtienen resultados que pueden considerarse de un mismo orden de magnitud. La metodología de ELL-CG-MS posee una sensibilidad que no permite determinar las bajas concentraciones de los HAPs de cuatro o más anillos condensados presentes en esta muestra de agua de mar natural contaminada por un fuel-oil. Este inconveniente, desde el punto de vista de validación de la metodología, permite poner de manifiesto la superior sensibilidad de la metodología de CPE-HPLC, propuesta en este trabajo para la determinación de HAPs en muestras de agua de mar.

Tabla III.13.- Recuperaciones de HAPs de muestras de agua de mar contaminadas con una disolución patrón de HAPs, aplicando la metodología de extracción/preconcentración por punto nube y determinación por HPLC.

HAP	Añadido (ng/mL)	Encontrado ^a	Recuperación (%)	Añadido (ng/mL)	Encontrado ^a	Recuperación (%)
N	0.30	0.098 ± 0.034	32.6 ± 11.4	0.58	0.218 ± 0.020	37.7 ± 3.5
Fl	0.20	0.099 ± 0.013	49.5 ± 6.5	0.58	0.360 ± 0.035	62.1 ± 6.1
Fe	0.20	0.167 ± 0.011	83.7 ± 5.7	0.46	0.422 ± 0.037	91.6 ± 8.1
A	0.10	0.054 ± 0.010	53.5 ± 9.9	0.23	0.145 ± 0.016	63.1 ± 6.9
Ft	0.80	0.566 ± 0.029	70.8 ± 3.6	1.45	1.145 ± 0.121	79.0 ± 8.3
P	0.40	0.279 ± 0.030	69.7 ± 7.4	0.87	0.636 ± 0.063	73.1 ± 7.3
B(a)A	0.10	0.072 ± 0.002	71.5 ± 2.5	0.23	0.210 ± 0.021	91.5 ± 9.0
Cr	0.30	0.257 ± 0.041	86.1 ± 13.7	0.58	0.604 ± 0.070	104 ± 12.1
B(b)Ft	0.20	0.148 ± 0.024	74.0 ± 12.0	0.46	0.396 ± 0.038	86.2 ± 8.3
B(k)Ft	0.20	0.142 ± 0.023	71.0 ± 11.7	0.23	0.172 ± 0.021	74.8 ± 9.1
B(a)P	0.07	0.074 ± 0.004	106 ± 6.2	0.14	0.150 ± 0.018	107 ± 13.2
diB(a,h)A	0.20	0.227 ± 0.010	114 ± 4.9	0.46	0.339 ± 0.040	73.6 ± 8.6
B(ghi)Per	0.20	0.230 ± 0.029	115 ± 14.5	0.35	0.282 ± 0.033	80.6 ± 9.5
I(1,2,3-cd)	0.60	0.399 ± 0.068	66.5 ± 11.4	1,16	0.804 ± 0.082	69.3 ± 7.1

^a Concentración de HAPs encontrados (ng/mL) ± desviación estándar (n=3).

Tabla III.14.- Características del método de análisis de HAPs por CG-MS.

HAP	Iones Moleculares	Intervalo de Linealidad (ppm)	LOD (ppm)*
N	128	0.25-3.00	0.20
Fl	165	0.25-3.10	0.25
Fe	178	0.25-3.10	0.18
A	178	0.25-3.10	0.19
Ft	202	0.25-3.15	0.30
P	202	0.25-3.15	0.26
B(a)A	228	0.27-3.20	0.19
Cr	228	0.27-3.20	0.24
B(b)Ft	252	0.28-3.30	0.27
B(k)Ft	252	0.28-3.30	0.31
B(a)P	252	0.28-3.30	0.28
diB(a,h)A	278	0.30-3.50	0.36
B(ghi)Per	276	0.30-3.50	0.34
I(1,2,3-cd)P	276	0.30-3.50	0.29

*LOD calculados como 3·Error estándar de la estimación/pendiente

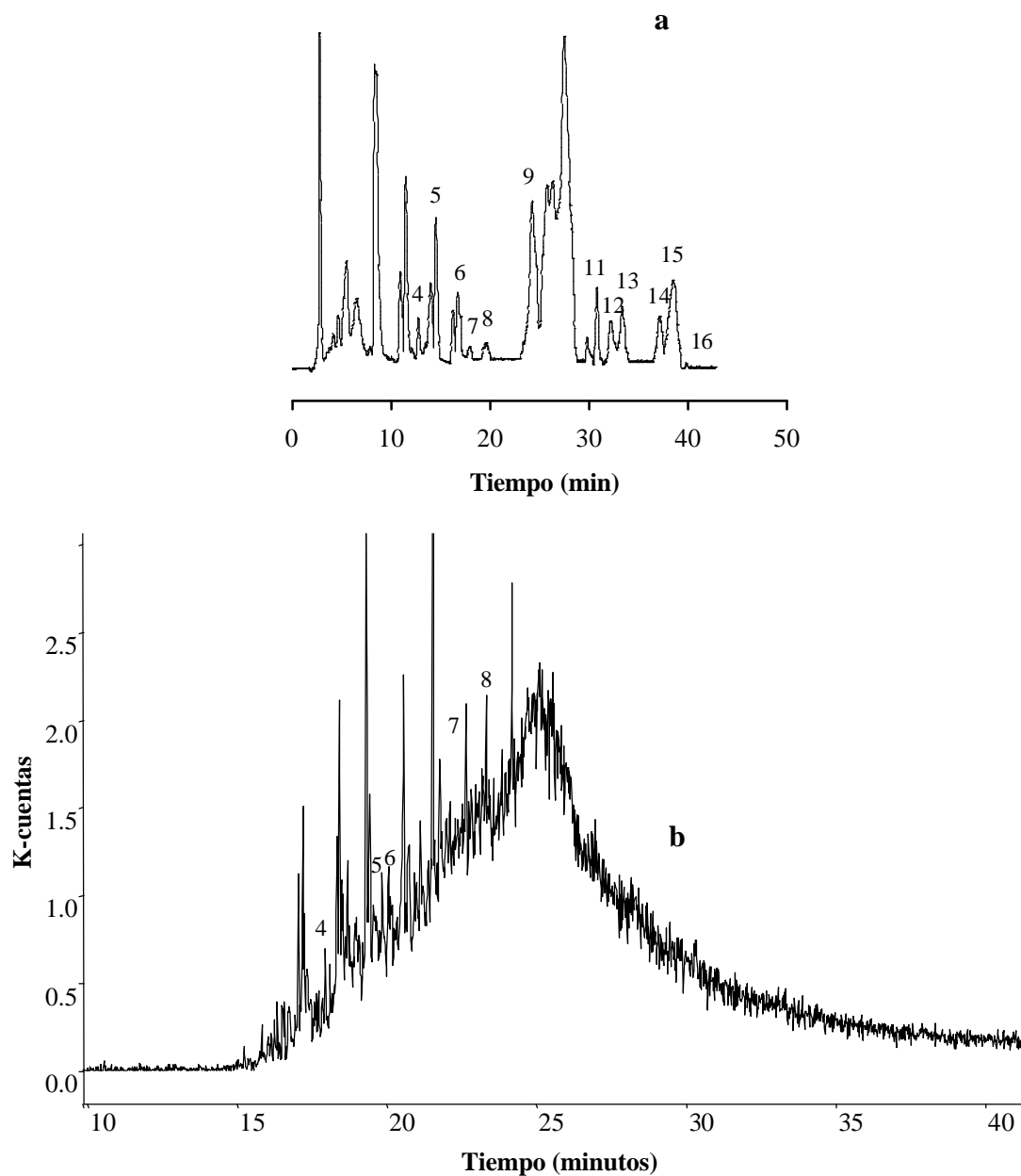


Figura III.15: (a) Cromatogramas obtenidos tras aplicar CPE-HPLC y (b) tras aplicar ELL-CG-MS (barrido de 128 a 278 u.m.a.), a una muestra de agua de mar natural contaminada por un fuel-oil.

Tabla III.15.- Concentraciones de HAPs hallados en agua de mar contaminada por un fuel-oil.

HAP	CPE+HPLC*	ELL+CG-MS*
Fl	0.32 ± 0.30	0.28 ± 0.33
Fe	1.85 ± 0.81	1.28 ± 0.13
A	0.19 ± 0.15	0.28 ± 0.15
Ft	0.21 ± 0.15	0.13 ± 0.17
P	0.19 ± 0.20	0.63 ± 0.53
B(a)A	0.05 ± 0.10	<0.19
B(b)Ft	0.40 ± 0.25	<0.27
B(k)Ft	0.05 ± 0.12	<0.31
B(a)P	0.18 ± 0.16	<0.28
diB(a,h)A	0.14 ± 0.15	<0.36
B(ghi)Per	0.35 ± 0.30	<0.34
I(1,2,3-cd)P	0.20 ± 0.15	<0.29

*Concentración de HAPs en ng/mL ± t·S_{xo} (t, P = 0.05, n = 12 en HPLC y n = 6 en CG-MS).

S_{xo} = Error en la concentración predicha utilizando la regresión lineal.

III.3.3.5.- Efecto del POLE en la estabilidad de los HAPs durante el almacenamiento de las muestras

La adsorción de los HAPs en los recipientes durante el almacenamiento de muestras de agua, es un fenómeno bien conocido y que causa pérdidas de estos analitos. Con objeto de solventar este problema, se suele recomendar la adición de disolventes orgánicos a las muestras acuosas [180,190,191]. También se ha descrito el uso de medios micelares no-iónicos como una

alternativa a los disolventes orgánicos [64,178,180]. Los estudios llevados a cabo con surfactantes iónicos, tales como cloruro de cetilpiridinio y dodecilsulfato sódico, han revelado que estos surfactantes también pueden ser útiles para estabilizar disoluciones acuosas de HAPs [180].

Por otra parte, los HAPs tienden a asociarse en cierta medida con materia orgánica o materia particulada suspendida en el agua de mar, en forma de complejos o por simple adsorción [178]. Este tipo de asociaciones tiende, en general, a hacer que se obtengan bajas recuperaciones de los HAPs especialmente cuando se llevan a cabo extracciones líquido-sólido [192]. La preconcentración de HAPs usando el surfactante no-iónico Triton X-114, ha sido propuesta como una herramienta útil para evitar las interferencias causadas por ácidos húmicos [180].

Con la finalidad de estudiar la eficacia del POLE para evitar la adsorción de los HAPs en las paredes de los recipientes en que están contenidos, así como la interferencia causada por la materia orgánica disuelta o materia particulada presente en agua de mar natural, se estudió tal efecto sobre 14 HAPs utilizados por nosotros en muestras de agua de mar natural almacenadas en recipientes de vidrio.

Para tal finalidad, dos alícuotas de agua de mar natural no filtrada y libre de hidrocarburos, se contaminaron con HAPs a niveles de concentración comprendidas entre 0.14 y 1.45 ng/mL. A una de estas alícuotas se le añade POLE desde el principio del experimento, para obtener una disolución final con una concentración de surfactante del 1% (p/v) en el surfactante. Ambas alícuotas se conservaron a una $T \approx 4^\circ\text{C}$. A períodos regulares de tiempo, previamente establecidos, 3 mL de cada alícuota se someten a extracción por punto nube, y las fases ricas en surfactante obtenidas se analizan por HPLC, según se ha descrito anteriormente.

La Tabla III.16 muestra los resultados hallados, expresando el porcentaje de recuperación en función del tiempo. En las muestras de agua de mar a las que no se ha añadido surfactante, se observa una disminución importante en la concentración de todos los HAPs durante las primeras 48 horas de almacenamiento, siendo de modo más patente para los hidrocarburos de mayor masa molecular. Al alargar dicho tiempo, siguen produciéndose disminuciones en las concentraciones de HAPs, aunque de forma más gradual. En sentido opuesto, las muestras que contienen POLE micelado no muestran variaciones importantes en las recuperaciones de los HAPs, al menos durante los ocho días que ha durado la experiencia. Se pone así de manifiesto el efecto inhibitor del POLE en la retención de estos contaminantes por procesos de adsorción o complejación.

Tabla III.16.- Efecto inhibitor del POLE sobre los procesos de adsorción que afectan a los HAPs, durante el almacenamiento de muestras de agua de mar contaminadas.

HAP	Recuperaciones (%)						
	0h	48h		76h		192h	
		a	b	a	b	a	b
1. N	37.7	43.3	31.2	33.2	18.9	40.2	15.5
4. Fl	62.1	60.0	56.6	53.7	54.4	63.8	34.4
5. Fe	91.6	87.9	86.4	78.0	69.9	95.8	59.2
6. A	63.1	62.4	55.3	53.1	34.6	61.2	47.2
7. Ft	79.0	77.6	71.0	66.0	63.2	73.5	45.6
8. P	73.1	69.5	64.1	55.1	41.6	69.5	44.0
9. B(a)A	91.5	84.7	79.0	72.9	59.4	80.6	47.4
10. Cr	104	100	93.7	84.8	69.0	102	68.3
11. B(b)Ft	86.2	83.3	71.0	73.5	58.2	79.1	51.1
12. B(k)Ft	74.8	71.0	60.0	61.9	46.9	69.2	42.1
13. B(a)P	107	102	87.8	90.5	59.7	94.9	49.9
14. diB(a,h)A	73.6	69.2	57.7	61.5	43.8	69.1	37.9
15. B(ghi)Per	80.6	75.2	59.1	63.4	46.0	76.2	39.4
16. I(1,2,3-cd)P	69.3	68.6	54.0	61.4	34.2	63.0	38.6
Media*	81.2	77.8	69.1	67.4	51.7	76.7	46.5

a Muestra almacenada en presencia de POLE al 1% (p/v) desde el principio

b Muestra almacenada en ausencia de surfactante

*Recuperaciones medias de HAPs excluyendo el naftaleno

Con objeto de establecer el efecto de la adsorción debido únicamente a las paredes del recipiente en que se almacena la disolución que contiene los HAPs, se ha realizado un estudio similar al que se acaba de comentar, pero utilizando agua de mar sintética y filtrada, en lugar de agua de mar natural. Las experiencias que se han prolongado durante 432 horas (18 días) y en

las que se han utilizado algunos de los HAPs que venimos empleando, conducen a los resultados agrupados en la Tabla III.17. En dicha Tabla se comparan los resultados correspondientes a muestras a las que se adiciona POLE desde el comienzo de la experiencia y a muestras que no contienen POLE durante su almacenamiento.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que los HAPs son adsorbidos tanto por la materia particulada como por las paredes de los recipientes, durante el almacenamiento de las muestras de agua de mar contaminadas con HAPs. Para evitar este inconveniente se puede recurrir a la aditivación con POLE en lugar de otros reactivos, en el momento de toma de muestra. De esta forma, el mismo surfactante que interviene en la formación del punto nube, permite minimizar los procesos de adsorción a que pueden verse sometidos los HAPs.

Tabla III.17.- Efecto inhibitor del POLE en procesos de adsorción de HAPs por la superficie de los recipientes contenedores en muestras de agua de mar.

HAP	Recuperaciones (%)							
	1h		24h		96h		432h	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Fl	120	64.3	72.0	66.1	62.2	57.3	59.9	9.40
Fe	119	96.0	102	102	93.9	90.1	107	32.8
Ft	81.5	81.3	96.4	74.1	77.7	58.6	65.5	33.6
P	75.2	75.2	82.8	98.7	76.0	69.2	70.0	33.5
Cr	125	107	126	108	119	130	125	49.1
diB(a,h)A	97.3	86.1	80.1	59.5	75.0	70.5	62.0	25.5
B(ghi)Per	119	82.8	87.4	65.1	79.9	77.0	75.5	25.5
Media*	105	84.6	92.4	81.9	83.4	79.0	80.7	29.9

a Muestra almacenada en presencia de POLE al 1% (p/v) desde el principio

b Muestra almacenada en ausencia de surfactante

CAPÍTULO IV

LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y LA DETERMINACIÓN DE HAPs

IV.1.- INTRODUCCIÓN

La Microextracción en Fase Sólida (SPME) es una técnica de extracción relativamente reciente, desarrollada por Pawliszyn y sus colaboradores [193], que representa un valioso avance en uno de los pasos fundamentales del proceso analítico, como es la preparación de muestras. Se basa en el equilibrio de reparto de los analitos, entre una fase polimérica estacionaria que recubre una fibra de sílice fundida y la matriz de la muestra.

La puesta en práctica de la SPME comprende dos pasos. En primer lugar, los analitos son extraídos desde la matriz que los contiene, por contacto de la muestra con una fibra recubierta de una fase activa, durante un tiempo predeterminado. En segundo lugar, la fibra se separa de la muestra y los analitos retenidos en la misma son entonces desorbidos en un instrumento analítico, generalmente un sistema cromatográfico, en el que se someten a procesos de separación y determinación cualitativa y/o cuantitativa. El paso de desorción, es decir, la liberación del analito retenido, suele realizarse colocando la fibra en un inyector caliente de un cromatógrafo de gases (desorción térmica). También puede realizarse en un sistema de HPLC, introduciendo la fibra en una interfase SPME-HPLC. El proceso completo es muy simple, puede automatizarse y acoplarse a cromatógrafos de gases o líquidos convencionales.

La Microextracción en Fase Sólida presenta importantes ventajas con respecto a las técnicas convencionales para la extracción de compuestos orgánicos de muestras medioambientales, tales como la extracción líquido-líquido [194] y la extracción en fase sólida [195,196] para compuestos semivolátiles y no-volátiles, la extracción con espacio en cabeza [197] y purga y trampa (*purge and trap*) [198] para sustancias volátiles. Entre dichas ventajas podemos destacar que:

-No requiere disolventes orgánicos, generalmente caros y con frecuencia perjudiciales para la salud y el medio ambiente.

-La técnica es muy simple, rápida, de fácil automatización, portátil y económica.

-Sólo se requiere un pequeño volumen de muestra.

-Puede acoplarse fácilmente a CG, con algunas modificaciones a HPLC, y recientemente

se ha acoplado a CE.

La técnica se desarrolló inicialmente para determinar compuestos relativamente volátiles en muestras medioambientales, pero su uso se ha extendido al análisis de una gran variedad de matrices y analitos. Hasta la fecha, SPME se emplea con éxito en el análisis de muestras gaseosas, líquidas y sólidas, y en un amplio rango de compuestos volátiles a no volátiles, incluyendo contaminantes ambientales tales como pesticidas, fenoles, PCBs, HAPs y, en menor medida, compuestos inorgánicos.

Con el uso de la microextracción en fase sólida se pueden realizar tres tipos diferentes de muestreo:

-Extracción Directa, que se caracteriza por la inmersión de la fibra, directamente, en la muestra líquida o gaseosa. Suele aplicarse al análisis de muestras relativamente limpias.

-Extracción en Espacio en Cabeza (HS-SPME), en la que la fibra se suspende en el espacio gaseoso en contacto con la muestra. Es una técnica adecuada para muestras líquidas sucias e, incluso, para muestras sólidas.

-Extracción con fibras protegidas con membranas, que es una variante de la extracción directa en la que la fibra, o mejor, el recubrimiento de la fibra, se protege frente a posibles daños. Es especialmente adecuada para la extracción de analitos en muestras muy contaminadas.

IV.1.1.- PARÁMETROS QUE AFECTAN AL PROCESO DE EXTRACCIÓN

En SPME, la cantidad de analito extraída por la fibra puede venir influenciada por varios parámetros como: características del recubrimiento, temperatura y tiempo del proceso de extracción, adición de sales o disolventes orgánicos a la muestra, modificación del pH, agitación de la muestra y volumen de la muestra. Los efectos de la matriz y la introducción de un paso de derivatización también pueden afectar la extracción de analitos en SPME.

IV.1.1.1.- *Recubrimientos*

La elección del recubrimiento más apropiado es muy importante para conseguir una buena selectividad para los analitos en estudio. El principio “*semejante disuelve a semejante*” puede aplicarse para seleccionar la fibra adecuada. En la Tabla IV.1 se presentan los recubrimientos de fibras disponibles comercialmente, así como algunas de sus propiedades, usos y aplicaciones. Además de éstas, diversos autores han desarrollado métodos para preparar fibras que presentan propiedades específicas para la extracción de determinados analitos [199,200].

Las primeras fibras usadas fueron las de polidimetilsiloxano (PDMS) y poliacrilato (PA). El polidimetilsiloxano es una fase no polar que extrae muy bien analitos no polares [201-209]. Sin embargo, también pueden emplearse en la extracción de compuestos más polares, tras optimizar condiciones de extracción tales como pH, concentración salina y temperatura. En el caso de fibras de PDMS, que se comercializan en diferentes grosores, se puede elegir el grosor de recubrimiento con el que se consiga el límite de detección requerido [210-212]. Como regla general, cuando se aplica directamente a extracciones acuosas, con agitación magnética, un recubrimiento de PDMS de 100 μm proporciona tiempos de equilibrio de menos de 1 h para compuestos con constantes de distribución menores que 10000 [193]. Para compuestos con constantes mayores, pueden considerarse recubrimientos más finos y entonces el tiempo de equilibrio es menor [213].

La fase de poliacrilato es útil para compuestos más polares. En este recubrimiento, los coeficientes de difusión son menores que en fibras de PDMS, por lo que el tiempo de extracción es más largo [214-217].

Recientemente se han introducido recubrimientos que contienen materiales más porosos y adsorbentes, como por ejemplo divinilbenceno (DVB) y Carboxen combinado con polidimetilsiloxano o Carbowax (CW). Estas fibras son más polares que las de PA y son adecuadas para extraer compuestos más polares, tales como alcoholes y éteres [218]. Por otra parte, las fibras carboxen-PDMS tienen gran área superficial y muestran gran potencial para la extracción de compuestos orgánicos del aire, como VOCs de bajo peso molecular.

Tabla IV.1.- Recubrimientos de fibras comercialmente disponibles: usos, algunas propiedades y aplicaciones.

Recubrimiento de fibra	Grosor (µm)	Uso recomendado	Temperatura máxima del inyector de CG (°C)	Aplicaciones
Poli(dimetilsiloxano) (PDMS)	100	CG, HPLC	280	Compuestos orgánicos no polares tales como VOCs, HAPs, benceno/tolueno/etilbenceno/xilenos y pesticidas organoclorados.
	30	CG, HPLC	280	
	7	CG, HPLC	340	
Poliacrilato (PA)	85	CG, HPLC	320	Compuestos orgánicos polares tales como triazinas, pesticidas organofosforados y fenoles.
Poli(dimetilsiloxano)-divinilbenceno (PDMS - DVB)	65	CG, HPLC	270	Hidrocarburos aromáticos, aminas aromáticas y VOCs.
	60	CG	270	
Carboxen-poli(dimetilsiloxano) (Carboxen - PDMS)	75	CG	320	Hidrocarburos y VOCs.
Carbowax-divinilbenceno (CW - DVB)	65	CG	260	Compuestos orgánicos polares tales como alcoholes, cetonas y cpts. nitroaromáticos.
Carbowax-templated resin (CW - TPR)	50	HPLC		Surfactantes aniónicos y aminas aromáticas.

IV.1.1.2.- Tiempo y temperatura del proceso de extracción

Puesto que la microextracción en fase sólida se basa en un proceso de equilibrio de distribución, la cantidad de analito extraída por la fibra se relaciona con el tiempo de equilibrio, siendo éste inversamente proporcional a la constante de distribución del compuesto. Con objeto de optimizar el tiempo de análisis, suelen construirse curvas que muestran la variación de la cantidad de analito extraída, en función del tiempo de equilibrio, escogiéndose el menor valor necesario para alcanzar el límite de detección deseado para el analito considerado. Es evidente que, para asegurar una buena reproducibilidad, es necesario un control preciso del tiempo de contacto entre la fibra y la muestra.

La agitación de la muestra aumenta la difusión de los analitos hacia el recubrimiento de la fibra y reduce el tiempo de extracción, tanto para la extracción directa como para la que se basa en la utilización del espacio en cabeza [193]. La agitación magnética es la técnica de agitación comúnmente usada, mientras que otras técnicas de agitación alternativas, como el empleo de ultrasonidos, mejoran los tiempos de extracción, pero todavía no se ha conseguido una agitación correcta de la muestra. Se han introducido desarrollos más recientes, tales como la combinación de vibración de la fibra y la celda con diseño de flujo a través de la fibra, especialmente para sistemas de SPME automatizados [219].

La temperatura a la que se realiza el proceso de distribución tiene efectos opuestos en la microextracción en fase sólida. En general, al aumentar la temperatura se favorece la difusión de los analitos hacia la fibra. Además, en el modo HS-SPME la temperatura ayuda a transferir los analitos hacia el espacio en cabeza. En sentido contrario, dado que el proceso de adsorción es exotérmico, los aumentos de temperatura hacen disminuir las constantes de distribución. En atención a lo expuesto, Pawliszyn y col. [193] han introducido las fibras enfriadas internamente, en las que al tiempo que se calienta la muestra, se produce un enfriamiento de la fibra.

IV.1.1.3.- Adición de sales y disolventes orgánicos

Algunos estudios muestran que la adición de una sal, generalmente cloruro sódico, provoca un aumento en la retención de los analitos en el recubrimiento de la fibra. Así, para analitos polares, tales como triazinas, la sensibilidad puede incrementarse por un factor superior a 10 [220]. La adición de sales incrementa la fuerza iónica del medio, reduciendo la solubilidad de los analitos por lo que resultan más fácilmente retenidos. Este efecto no es general y depende de la polaridad del analito, la concentración de la sal y la matriz de la muestra.

La influencia de la adición de disolventes orgánicos a muestras acuosas no ha sido aún suficientemente investigado, aunque en general se observa que su presencia reduce la cantidad de analito extraída. Así, Eisert y Levsen [221] han mostrado que, al aumentar el contenido de metanol por encima del 20% en disoluciones acuosas de triazinas, se reduce la respuesta por un factor de dos. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto que la adición de disolventes orgánicos en suelos y lodos aumenta la difusión de analitos de la muestra hacia el recubrimiento de la fibra, con el consiguiente aumento de la eficacia de la extracción [220].

IV.1.1.4.- Volumen de la muestra

El volumen de la muestra es un parámetro directamente relacionado con la sensibilidad del método y, en consecuencia, es importante optimizarlo en SPME. Debe tenerse en cuenta que el volumen de la muestra es mucho mayor que el volumen de la fibra, y la cantidad de analito extraída es sólo una fracción del total, proporcional al coeficiente de reparto, a la concentración de analito en la muestra y al volumen de la fibra. Los compuestos con altas constantes de distribución (K_{fs}) se ven más afectados por cambios en el volumen de la muestra, que compuestos con pequeña afinidad por la fibra. Por esta razón, para escoger el volumen de muestra más adecuado, se debe tomar en consideración el valor de K_{fs} para los distintos analitos [193].

En HS-SPME, los analitos están distribuidos entre la matriz de la muestra, el recubrimiento de la fibra y el volumen de espacio en cabeza, que debe ser pequeño para

concentrar los analitos antes de que difundan hacia el recubrimiento de la fibra. Si el volumen del espacio en cabeza es muy grande, la sensibilidad se reduce considerablemente [222].

IV.1.1.5.- Efecto matriz

Algunos autores han investigado los efectos de la matriz en la eficacia de extracción de los analitos [223]. Así, los ácidos húmicos y fúlvicos que pueden estar presentes en muestras de agua reales, son capaces de reducir la cantidad de analito extraída, debido a la interacción entre la materia orgánica disuelta y los analitos. Pörsschmann y col. [224-226] usan la SPME para determinar el grado de asociación entre contaminantes de baja masa molecular, tales como fenoles y HAPs con materia orgánica húmica presente en aguas contaminadas.

IV.1.1.6.- Derivatización

Es conocido que la derivatización puede permitir la determinación de compuestos polares en muestras de diverso tipo. Este proceso puede combinarse con la microextracción en fase sólida de tres formas diferentes: derivatización directa en la matriz de la muestra, derivatización en el recubrimiento de la fibra y derivatización en el puerto de inyección del CG [227]. La primera modalidad es la derivatización directa en la matriz de la muestra, seguida por la extracción de los derivados por SPME. Ha sido utilizada, por ejemplo, para la determinación de fenoles por transformación en los correspondientes derivados acetato que posteriormente son sometidos a SPME. La derivatización en el recubrimiento de la fibra puede llevarse a cabo de dos maneras: derivatización y extracción simultánea, o derivatización después de la extracción. En el primer caso, la fibra, conteniendo el reactivo derivatizante, se pone en contacto con la muestra en la que se encuentran los analitos; mientras que, en el segundo caso, los analitos son extraídos por la fibra y a continuación son expuestos al reactivo derivatizante. La derivatización en el inyector se lleva a cabo cuando los analitos pueden ser derivatizados a temperaturas elevadas [228].

IV.1.2.- EL PROCESO DE DESORCIÓN

Los analitos retenidos en el recubrimiento de la fibra pueden ser desorbidos en sistemas cromatográficos, HPLC o CG, o de electroforesis. En la actualidad, la mayoría de las aplicaciones de la SPME se llevan a cabo en combinación con la CG, ya que el acoplamiento es muy simple porque el puerto de inyección del cromatógrafo de gases puede usarse para la desorción térmica de los analitos retenidos en la fibra. Cuando la temperatura se incrementa, la afinidad de los analitos por la fibra se reduce y estos se liberan. Además, el flujo del gas portador en el inyector también ayuda a separar los analitos de la fibra y transferirlos a la columna cromatográfica. Para la mayoría de los compuestos la desorción generalmente se consigue en menos de dos minutos. Desde un punto de vista práctico, conviene tener en cuenta que la temperatura del inyector y la velocidad de flujo del gas portador determinan el tiempo de desorción del proceso de SPME. En general, la temperatura del inyector se fija a la temperatura máxima para la estabilidad del recubrimiento de la fibra. No obstante, los compuestos con alto peso molecular normalmente necesitan temperatura de desorción superiores. En consecuencia, estos compuestos pueden permanecer retenidos en el recubrimiento de la fibra y aparecer en subsiguientes análisis (efecto *carry-over*). La utilización de tiempos de desorción elevados puede ayudar a reducir este efecto.

IV.1.3.- APLICACIONES DE SPME AL ANÁLISIS DE MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES

Una gran variedad de muestras medioambientales, tales como aire, agua y suelos o lodos han sido analizados con el empleo de metodologías que hacen uso de la SPME. La Tabla IV.2 resume algunas referencias y condiciones experimentales, así como el tipo de fibra empleada en cada aplicación.

IV.1.3.1.- Muestras gaseosas

La aplicación de la SPME al análisis de muestras de aire es muy reciente dado que entraña dificultades importantes como, por ejemplo, la preparación de patrones a utilizar en los procesos de calibración y la obtención de resultados reproducibles, ya que la calibración y el muestreo siempre han de hacerse a la misma temperatura.

Namiesnik y col. [229] han desarrollado un método para determinar contaminantes orgánicos de matrices gaseosas, preparando mezclas de patrones con el uso de un sistema apropiado para la generación dinámica de mezclas de gases, a la par que se evalúa cómo la temperatura y la humedad afectan a las respuestas correspondientes a los distintos compuestos.

Cuando es posible determinar los coeficientes de reparto (K_{fs}) no es imprescindible la preparación de patrones para cuantificar los analitos. Martos y col. [230] han propuesto un método para estimar estos coeficientes. En dicho método, la dependencia de la cantidad extraída con la temperatura se determina calculando la expresión teórica que describe el coeficiente de reparto a cualquier temperatura, para cada par fibra-analito [231]. Este método ha sido usado para la determinación de formaldehído, isoparafinas y compuestos aromáticos como el estireno [230,232]. Para la extracción de compuestos volátiles presentes en muestras de aire, se han utilizado las distintas fibras comercializadas. En la actualidad, la introducción de nuevas fibras que poseen elevadas superficies, tales como las Carboxen-PDMS, muestra resultados alentadores [233].

IV.1.3.2.- Muestras acuosas

La inmersión directa es el modo de muestreo más frecuente cuando se utiliza la SPME con muestras acuosas. Como ejemplo de aplicación, Lee y col [234] han desarrollado un método para determinar herbicidas ácidos en agua, utilizando la SPME como método de separación, seguido por una post-derivatización de los compuestos retenidos en la fibra. Estos compuestos son muy polares y no pueden ser determinados directamente por CG, pero la conversión en los

correspondiente ésteres metilados por derivatización hace posible el análisis por CG.

El modo de muestreo HS-SPME también se emplea para extraer compuestos orgánicos de muestras acuosas. Por ejemplo, Page y Lacroix [222] han desarrollado un método para determinar pesticidas organoclorados en muestras de agua usando HS-SPME-CG-ELCD. Además, se evalúa cómo la cantidad de analito extraída resulta ser afectada por la adición de sales, la temperatura y tiempo de absorción, así como los volúmenes de espacio en cabeza y muestra. Con pequeños volúmenes de muestra (15 ml) los límites de detección varían entre 0.3-0.8 ng/L y las repetibilidades entre el 5.9 y el 21.7%.

Doong y col. [235] utilizan la inmersión directa y la modalidad de espacio en cabeza para la extracción de HAPs de alto peso molecular presentes en muestras acuosas. Asimismo, estos autores [236], han realizado la optimización y validación de procedimientos SPME- CG-FID y SPME-CG-MS para la determinación de los 16 HAPs considerados como prioritarios por la EPA en muestras de agua. Evalúan cinco tipos diferentes de fibras, así como otros parámetros que afectan a la extracción de los analitos.

IV.1.3.3.- Muestras sólidas

Para este tipo de muestras sólo se han publicado un reducido número de trabajos que describen métodos para la determinación de contaminantes medioambientales. Lee y col [215] usan la SPME, acoplada con CG-MS, para determinar cinco clorofenoles en lixiviados de vertederos y muestras de suelos reales. Antes de que las muestras reales fueran analizadas, se evaluaron las condiciones de absorción y desorción y los efectos de la presencia de ácidos húmicos y surfactantes en la determinación de clorofenoles en muestras de agua. Los límites de detección son del orden de ng/L y los RSD(%) en condiciones de repetibilidad varían entre 5 y 9% (n=8) en muestras de agua.

Tabla IV.2.- Aplicaciones de la microextracción en fase sólida a muestras medioambientales

Compuestos	Recubrimiento de la fibra	Condiciones SPME (absorción, desorción)	Referencias
Pesticidas	PDMS	30 min; 3 min a 260 °C	220, 239-242
	PA	45 min a 60 °C; 2 min a 260 °C	205,212,221, 240,243
	XAD	30 min; 20 min a 270 °C	-
	PDMS-DVB	30 min; 5 min a 280 °C	-
	Carbowax-DVB	-	-
Fenoles y derivados	PA	60 min; 8 min a 250 °C	215,244-246
VOCs	PDMS	20 min a 80°C; 5 min a 200 °C	247
	PA	12 min; 5 min a 260 °C	-
	Carboxen-PDMS	30 min; 2 min a 300 °C	-
Compuestos BTEX	PDMS	10 min; 2 min a 150 °C	232
	Carboxen-PDMS	30 min; 2 min a 300 °C	-
HAPs	PDMS	30 min; 2 min a Temp. ambiente	224
	PDMS-DVB	-	248
	Carbowax-DVB	-	248
	Carbowax-TPR	-	248
	C18	30 min a 60 °C; 1 min a 300 °C	-
PCBs	PDMS	5 horas; 1 min a 300 °C	249
	Fases fenil	30 min a 60 °C; 1 min a 300 °C	-
Clorobencenos	PDMS	25 min a 30 °C; 3 min a 250 °C	-
	PA	30 min a 50 °C; 5 min a 280 °C	-

Santos y col. [237] desarrollan un método basado en HS-SPME y CG-MS para determinar clorobencenos en un suelo contaminado industrialmente. En el trabajo se optimizan los parámetros que afectan al proceso de SPME aplicado a muestras de suelo, tales como la adición de agua y de disolventes orgánicos a la muestra, así como la temperatura de extracción. Los autores muestran que los incrementos de la temperatura de extracción no producen mejoras en la respuesta cuando se determinan clorobencenos. Probablemente, la reducción de los coeficientes de reparto entre la fibra y el espacio en cabeza cuando aumenta la temperatura justifica que la temperatura no favorezca el proceso de extracción. Asimismo se comparan los efectos de la adición de diferentes volúmenes de etanol, metanol, diclorometano y acetona. Los resultados obtenidos con HS-SPME concuerdan con los obtenidos al emplear una extracción convencional mediante Soxhlet y, además, son concordantes con los obtenidos en un ejercicio de intercomparación europeo. Los clorobencenos presentes en una muestra certificada de suelo, CRM-529, fueron cuantificados por adiciones estándar. La reproducibilidad obtenida fue buena, entre 3 y 5%, con LODs que varían entre 0.03 y 0.01 ng/g de suelo.

La microextracción en fase sólida acoplada con CG-MS se ha aplicado a la determinación de sedimentos marinos enriquecidos con HAPs [238]. La reproducibilidad de la técnica, expresada como desviación estándar relativa, presenta valores inferiores al 13% para naftaleno, acenafteno, fluoreno, antraceno, fluoranteno y pireno y al 28% para benzo(a)antraceno. Los límites de detección estimados resultan ser menores de 1.5 $\mu\text{g/Kg}$ de muestra seca.

IV.1.4.- OBJETO DEL TRABAJO

La microextracción en fase sólida se ha mostrado eficaz para la extracción de solutos disueltos en disolventes polares y, en especial, en medios acuosos. De aquí que las escasas aplicaciones de la SPME a muestras sólidas, implican la introducción de un proceso inicial en que la muestra se trata preferentemente en agua. Sin duda, este hecho significa una limitación importante puesto que, desde un punto de vista práctico, quedan marginados aquellos compuestos con una solubilidad reducida en agua.

En los capítulos anteriores, se ha descrito la utilización de medios micelares en la extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes tanto en sedimentos marinos como en agua de mar, como etapa previa al análisis de estos compuestos por HPLC.

En atención a lo expuesto, nos hemos propuesto, como objetivo global del presente capítulo, combinar el empleo de medios micelares con la microextracción en fase sólida, para conseguir la solubilización y extracción de HAPs contenidos en sedimentos marinos. De esta forma, los tratamientos previos a realizar en el análisis de compuestos poco polares contenidos en muestras sólidas podrían quedar reducidos a una etapa de solubilización de los mismos en la disolución acuosa de un surfactante, seguido de otra etapa en la que los analitos se separan de esta fase acuosa mediante la SPME, sin necesidad de procesos intermedios de separación o cambio de fases.

Para alcanzar este objetivo global se introducen otros, de carácter parcial, como los que se citan a continuación:

- Estudio de los equilibrios de distribución, para cada uno de los HAPs que se han venido considerando, entre una fase acuosa y la fase estacionaria, de polidimetilsiloxano o de poliacrilato, que constituyen el recubrimiento de las fibras utilizadas en la SPME.
- Estudiar la influencia que la presencia de surfactantes catiónicos, aniónicos y no iónicos, ejercen en el proceso de retención de los HAPs por los recubrimientos de las fibras mencionadas.
- Establecimiento de un procedimiento para la determinación de HAPs presentes en sedimentos marinos, basado en la solubilización de los hidrocarburos en un medio micelar, con la participación de radiación de microondas, seguida de microextracción en fase sólida y posterior determinación por cromatografía de gases con espectrometría de masas.

IV.2.- PARTE EXPERIMENTAL

IV.2.1.- REACTIVOS Y MATERIALES

La mayoría de los reactivos utilizados se describen en capítulos anteriores.

Los surfactantes utilizados son los mismos que en II.2.1.

La disolución estándar de HAPs empleada es la misma que se describe en III.2.1. Los HAPs se disuelven primeramente en acetona (Merck), y a continuación en agua Milli-Q.

Las microfibras utilizadas fueron polidimetilsiloxano de 100 μm (Supelco 57301) y poliacrilato de 85 μm (Supelco 57305). Se acondicionaron antes de su uso de acuerdo con las condiciones especificadas por el fabricante, 1 h a 250 °C la fibra de polidimetilsiloxano, y 2 h a 300 °C la fibra de poliacrilato.

Para el lavado del material de vidrio que iba a ser utilizado se procedió primeramente a un lavado con abundante agua y jabón, y posterior lavado con agua destilada. A continuación se realizó un lavado con metanol (Merck) y posterior enjuague con la mezcla acetona:etanol (1:1), ambos disolventes también Merck. El material de vidrio no graduado, y muy especialmente, los viales de extracción, se sometieron finalmente una hora a 550 °C en la mufla.

IV.2.2.- EQUIPOS

El equipo de extracción por microondas es el que se describe en II.2.2.

El cromatógrafo de gases-masas es el mismo que se describe en III.2.2.4. El muestreador automático viene acoplado a un fijador de la fibra, Supelco modelo 57331. En este sistema se hace necesaria la utilización de un carrusel de 12 viales, preparado para viales de 10 mL. Dichos viales 2-7389, color topacio, fueron suministrados también por Supelco.

IV.2.3.- METODOLOGÍAS

IV.2.3.1.- *Método cromatográfico de análisis*

El método utilizado es el mismo que se describe en III.2.3.3., en cuanto a condiciones de operación del CG-MS. En este caso, asimismo se precisa de un tiempo de agitación de la fibra en la muestra (que viene predeterminado según el experimento a realizar, el tipo de fibra y el tipo de muestra) y un tiempo de desorción de la fibra en el inyector que se fija a 5 minutos.

IV.2.3.2.- *Procedimiento de microextracción en fase sólida*

La extracción por SPME se llevó a cabo colocando 10 mL de disoluciones acuosas o micelares de estándares de HAPs en los viales provistos de tapa con septum de PTFE. El equilibrio SPME se consigue por inmersión de la fibra a temperatura ambiente por un período de tiempo apropiado, durante el cual los analitos son absorbidos por la fase estacionaria de la fibra. Tras la extracción, las fibras son desorbidas térmicamente durante 5 minutos en el inyector del cromatógrafo de gases. Mientras tiene lugar la desorción, la temperatura del inyector depende del tipo de fibra utilizada. Así, para la fibra de PDMS la temperatura del inyector se mantiene a 40 °C durante 0.1 minutos, y a continuación se eleva a 270 °C a una velocidad de 200 °C/min, manteniéndose a esa temperatura mientras tiene lugar la desorción de la fibra en el inyector. En el caso de la fibra PA, la temperatura del inyector se mantiene a 40 °C también durante 0.1 minutos, y a continuación se eleva a 300 °C a una velocidad de 200 °C/min, manteniéndose a esa temperatura durante la desorción.

El posible “*carry-over*” se minimiza haciendo uso de blancos de agua destilada entre las muestras, y llevando a cabo una desorción térmica de las fibras en el inyector a la temperatura y tiempo de acondicionamiento de las mismas.

Un ejemplo representativo de cromatograma obtenido por SPME-CG-MS de estándares de HAPs en medio micelar, concretamente en POLE al 0.88% (p/v), se muestra en la Figura IV.1.

En la Figura IV.2 (a) se muestra un cromatograma típico de estándares de HAPs en medio acuoso tras ser sometidos a SPME y CG-MS con la fibra de PDMS de 100 μm . La Figura IV.2 (b) se corresponde a una determinación típica de HAPs en medio acuoso realizada con la fibra de PA de 85 μm . Las condiciones de obtención de los cromatogramas son las ya descritas.

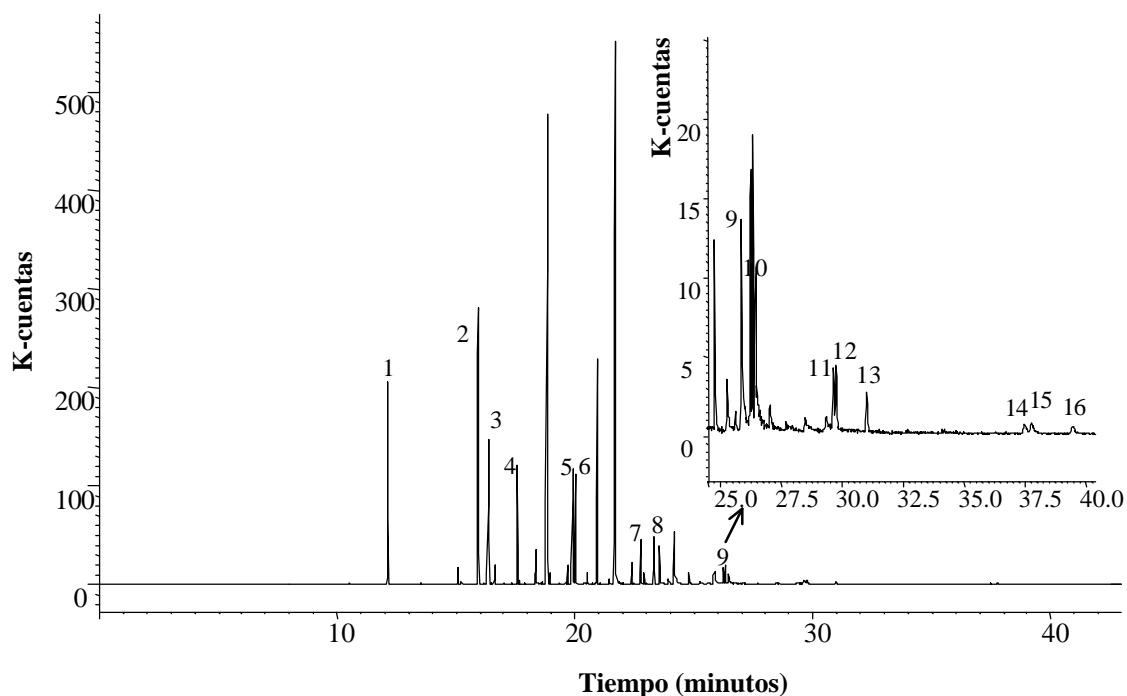


Figura IV.1: Cromatograma de una disolución estándar de 50 ppb de HAPs en POLE al 0.88% (p/v) tras ser sometidos a microextracción en fase sólida con la fibra de PA de 85 μm y CG-MS en las condiciones descritas. (Barrido de 128 a 278 u.m.a.).

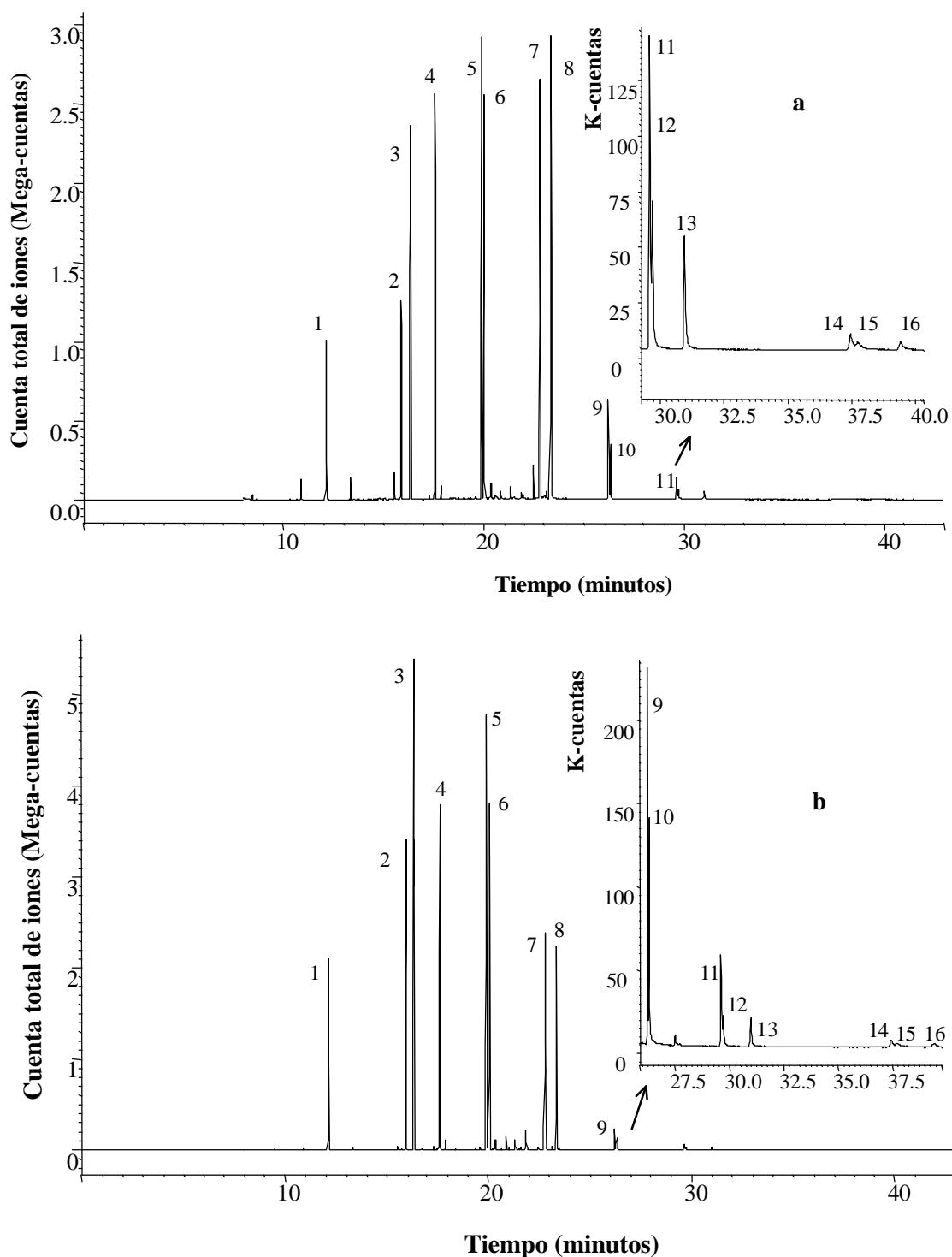


Figura IV.2: Cromatograma de HAPs en las condiciones optimizadas, obtenido tras SPME-CG-MS (barrido de 50 a 300 u.m.a., RIC) realizado con (a) fibra de PDMS de 100 μm y 40 ppb de HAPs en medio acuoso y (b) fibra de PA de 85 μm y 60 ppb de HAPs en medio acuoso.

IV.2.3.3.- Procedimiento de microextracción de HAPs en el sedimento marino certificado

La extracción del sedimento de referencia por microondas se realiza de acuerdo con las condiciones optimizadas descritas en II.2.5.2. A 200 mg del sedimento de referencia se la añaden 10 mL de una disolución al 1.25% (p/v) en POLE. Tras colocar una membrana de ruptura en el vaso extractor de microondas, se cierra y se introduce en el horno de microondas. La extracción se lleva a cabo a una presión máxima en el interior del vaso de 2.03 bares durante 5 minutos y con una potencia del horno de microondas del 60% (378 W). Una vez que el tiempo de extracción finaliza, los vasos de extracción se dejan enfriar a temperatura ambiente antes de abrirlos. Se toman 7 mL del sobrenadante del extracto del sedimento de referencia y se filtran a través de membranas HV Durapore de 45 μm , diluyéndose a continuación hasta 10 mL con agua destilada, quedando por tanto la disolución resultante en POLE al 0.88% (p/v). El extracto así diluido se coloca en el vial y se somete a las condiciones, también optimizadas, de microextracción en fase sólida con la fibra de PA de 85 μm , y posterior cuantificación por calibración en POLE al 0.88% (p/v).

IV.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.3.1.- MICROEXTRACCIÓN DE HAPs EN MEDIO ACUOSO

La microextracción en fase sólida puede usarse tanto para muestras acuosas como para muestras gaseosas. En ambos casos, hay un reparto de los analitos entre la matriz en que se encuentran los analitos y la fase estacionaria. El coeficiente de reparto se expresa como la relación entre las concentraciones de analito en la fase estacionaria y en la fase acuosa:

$$K_{fs} = C_f/C_s \quad [IV.1]$$

siendo C_f es la concentración de analito en la fase estacionaria y C_s la concentración de analito en la fase acuosa.

La cantidad de analito en la fase estacionaria vendrá dada por:

$$n_f = \frac{K_{fs} V_f V_s C_{in}}{K_{fs} V_f + V_s} \quad [IV.2]$$

en la que V_f es el volumen de la fase estacionaria, V_s es el volumen de muestra y C_{in} la concentración inicial del analito en la muestra. Si el volumen de la fase acuosa es prácticamente infinito comparado con V_f , la ecuación [IV.2] queda reducida a lo siguiente:

$$n_f = K_{fs} V_f C_{in} \quad [IV.3]$$

La aplicación de esta expresión en procesos de microextracción en fase sólida para muestras acuosas, implica aceptar ciertas suposiciones como las siguientes:

- En el transporte de los analitos desde la disolución que contiene la muestra hasta la fase estacionaria sólo interviene la difusión.
- No son necesarios aportes adicionales de energía para transferir los analitos desde la

disolución hasta el recubrimiento de la fibra.

-La concentración de los analitos en la muestra no afecta a las propiedades físicas de la fase estacionaria.

De acuerdo con el modelo teórico establecido, en una muestra homogéneamente mezclada suele cumplirse que [250]:

- Existe difusión de los analitos desde la muestra hasta la fase estacionaria, pero no hay difusión en la disolución.

- La concentración del analito en la fibra aumenta con el tiempo de contacto entre la muestra y la fibra. Al principio, dicho aumento se produce rápidamente, para ir disminuyendo luego la velocidad de reparto, hasta alcanzar el equilibrio, transcurrido un cierto tiempo, que se conoce como tiempo de equilibrio.

- El tiempo de equilibrio es inversamente proporcional al coeficiente de difusión del analito en el recubrimiento y directamente proporcional al cuadrado del grosor de la fase estacionaria. La evidencia experimental muestra que, en la práctica, es difícil alcanzar una disolución mezclada homogéneamente. Al menos, en la fina capa estática de disolución que rodea a la fibra debe admitirse que no existe difusión del analito. En consecuencia, los tiempos de equilibrio son siempre superiores a los preestablecidos teóricamente.

- La cantidad de analito retenida es proporcional al grosor de la fase estacionaria. De esta forma, entre la cantidad de analito a extraer y el tiempo de equilibrio debe establecerse una solución de compromiso, basado en el empleo de un grosor óptimo de recubrimiento de la fibra.

- Para una muestra no sometida a agitación, la difusión de los analitos a través de la fase acuosa conlleva unos tiempos de equilibrio que pueden ser hasta cien veces superiores a los observados con muestras agitadas.

- Para analitos con pequeños valores de los coeficientes de reparto, el tiempo de equilibrio puede ser muy largo, incluso cuando se agitan las muestras. Para evitar este inconveniente, al menos parcialmente, pueden utilizarse tiempos de muestreo inferiores

al tiempo de equilibrio, en base a que entre la cantidad de analito retenida en la fibra y su concentración inicial en la muestra existe una relación lineal, aunque no se haya alcanzado el tiempo de equilibrio. De esta forma, si los límites de detección requeridos para un analito determinado no son demasiado bajos, pueden disminuirse los tiempos de extracción, siempre que el muestreo se realice en condiciones controladas de temperatura y agitación.

IV.3.1.1.- *Perfiles de tiempos de extracción*

Puesto que la microextracción en fase sólida es un proceso de equilibrio entre la matriz de la muestra y una fase estacionaria polimérica de la fibra, es necesario determinar el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio para los analitos en estudio. El tiempo de equilibrio determina la máxima cantidad de analito que puede ser extraída por las fibras y, por tanto, la sensibilidad del método.

Las características de la fibra empleada pueden afectar el comportamiento de retención de los analitos en la muestra. En consecuencia, al iniciar el estudio de los tiempos de equilibrio asociados a la microextracción en fase sólida, se han seleccionado fibras con dos recubrimientos diferentes: PDMS de 100 μm y PA de 85 μm , cuyas características se encuentran descritas en la Tabla IV.3. Como analitos, se utilizan los mismos hidrocarburos aromáticos policíclicos que los empleados en capítulos anteriores, disueltos en este caso en medio acuoso.

Los perfiles correspondientes a los tiempos de extracción se establecieron por medida de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos para cada HAP como una función del tiempo de exposición. Las fibras se ponen en contacto con disoluciones patrón de los dieciséis HAPs propuestos como prioritarios por la EPA, a una concentración de 10 ng/mL, variando el tiempo de extracción entre 15 y 600 min. Todas las extracciones se realizaron a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) y con vibración de la fibra.

Tabla IV.3.- Características de las microfibras utilizadas.

	Polimetilsiloxano (PDMS)	Poliacrilato (PA)
Grosor (μm)	100	85
Tipo	No enlazada	Parcialmente enlazada
$T_{\text{máx}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	280	320
$T_{\text{recomendada}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	200-270	220-310
T_{trabajo} ($^{\circ}\text{C}$)	270	300
$T_{\text{acondicionamiento}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	250	300
$t_{\text{acondicionamiento}}$ (h)	1	2

La Figura IV.3 muestra los perfiles de tiempo de extracción para los HAPs considerados haciendo uso de fibras PDMS de 100 μm . Los resultados obtenidos muestran que los equilibrios dependen del compuesto extraído y varían significativamente para los distintos HAPs. Los tiempos de equilibrio para los HAPs en estudio aumenta con la masa molecular. Los tiempos de equilibrio fueron: 15 min para el naftaleno, 25 min para el acenaftileno y acenafteno, 50 min para el fluoreno, 60 min para el fenantreno y antraceno, 150 min para el fluoranteno y 200 min para el pireno. Hidrocarburos como benzo(a)antraceno, criseno y benzo(b)fluoranteno presentan tiempos de equilibrio muy superiores, del orden de los 600 min.

No es posible determinar el tiempo de equilibrio para los HAPs de cinco y seis anillos como: benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(ah)antraceno, benzo(ghi)perileno e indeno(1,2,3-cd)pireno. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por otros autores [251], que han establecido que en tiempos de 80 horas no se llegan a alcanzar los equilibrios de distribución con hidrocarburos de seis anillos.

Estos tiempos de equilibrio tan largos, son debidos a la pequeña solubilidad en agua y a los bajos coeficientes de difusión de los HAPs con elevado número de anillos. Las difusividades de los HAPs de alto peso molecular, en fase acuosa, varían entre $6.3 \cdot 10^{-6}$ y $7.4 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$, mientras que las difusividades aparentes en materiales poliméricos pueden decrecer hasta 10^{-8} ó $10^{-9} \text{cm}^2/\text{s}$.

La Figura IV.4 muestra los perfiles de tiempos de extracción para los mismos 16 HAPs usando fibras de PA de $85 \mu\text{m}$. Los perfiles de temperatura obtenidos en este caso son similares a los obtenidos con fibras PDMS, aunque los tiempos de equilibrio son mayores. Los resultados ponen de manifiesto que, al igual que con el recubrimiento de polidimetilsiloxano, el tiempo de equilibrio depende del compuesto extraído y varía significativamente entre los distintos compuestos, aumentando con la masa molecular. Los tiempos de equilibrio obtenidos a partir de los datos experimentales son: 40 min para el naftaleno, 120 min para el acenaftileno, 150 min para el acenafteno y fluoreno, 200 min para el fenantreno y antraceno, 350 min para el fluoranteno y pireno. Con los tiempos de extracción máximos considerados en este estudio no es posible alcanzar el equilibrio para hidrocarburos de mayor masa molecular.

Como resumen, a partir de los resultados obtenidos puede concluirse señalando que:

- Los equilibrios de distribución dependen del compuesto considerado y pueden variar considerablemente para compuestos diferentes.
- Los tiempos de equilibrio para los distintos HAPs considerados aumentan con la masa molecular.
- Fibras diferentes exhiben diferentes perfiles de extracción. En general, para los HAPs estudiados se consiguen menores tiempos de equilibrio con las fibras de polidimetilsiloxano que con las de poliacrilato.

Según hemos comentado con anterioridad, es posible utilizar tiempos de extracción menores que los correspondientes tiempos de equilibrio, basándose en que existe una relación lineal entre la cantidad de analito retenida en la fibra y su concentración inicial en la muestra. Dichos tiempos de extracción se seleccionan atendiendo a los límites de detección requeridos para el análisis de los analitos que se consideren.

Con objeto de comparar la eficacia de extracción de las dos fibras estudiadas para cada uno de los HAPs seleccionados, se ha elegido un tiempo de extracción de 100 minutos. Experimentalmente, la eficacia de la extracción se ha estimado por medida de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos después de la desorción en un CG. Los resultados obtenidos que se muestran en la Figura IV.5, ponen de manifiesto que todos los HAPs en estudio pueden ser extraídos por ambas fibras en el tiempo de extracción utilizado. También se observan comportamientos diferentes para los distintos HAPs.

Cuando se usan fibras de PDMS, la eficacia de la extracción se incrementa con el aumento de la masa molecular, al pasar del naftaleno al fenantreno-pireno. Los HAPs con 3 y 4 anillos, tales como fenantreno, antraceno, fluoranteno y pireno son los compuestos que se retienen en mayor cantidad, disminuyendo la eficacia de la extracción para los HAPs de mayor y menor número de anillos. Sin embargo, la disminución de las áreas de los picos es mucho mayor para HAPs con 5 ó 6 anillos, hidrocarburos que como ya vimos presentaban tiempos de equilibrio muy largos.

Con la utilización de una fibra de PA se observan incrementos en la eficacia de la extracción para los HAPs de bajo peso molecular, alcanzándose áreas máximas para HAPs como fluoreno, fenantreno y antraceno. Por el contrario, los HAPs de alto peso molecular, con más de cuatro anillos, son menos extraídos que cuando se usan las fibras de PDMS debido a que, en efecto, las fibras PA tienen un recubrimiento más polar y presentan menor afinidad para los HAPs con mayor número de anillos aromáticos.

Los HAPs incluidos en este estudio son compuestos clasificados como poco polares o no polares, en atención a sus pequeñas solubilidades en agua y a sus relativamente altos coeficientes de reparto octanol-agua. A su vez, las fibras de PDMS han sido diseñadas para la extracción de compuestos no-polares, mientras que las fibras de PA son consideradas como utilizables para la extracción de compuestos polares. Los resultados obtenidos muestran que la clasificación de las fibras, en función de la polaridad de los HAPs, es válida en términos de afinidad, y que ambos tipos de recubrimiento pueden ser válidos según el grupo de HAPs que se desee extraer de forma preferente.

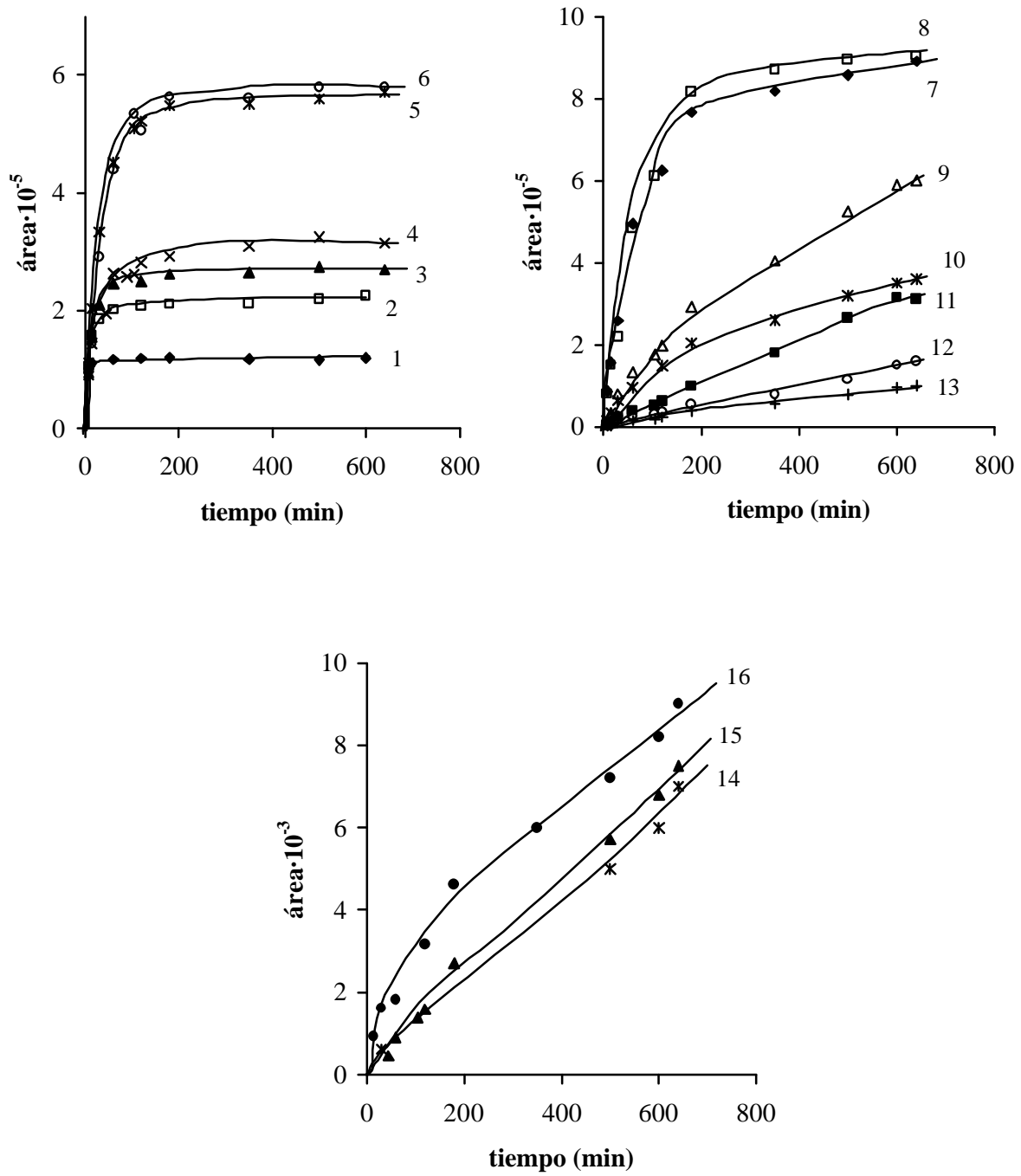


Figura IV.3: Perfiles de tiempos de extracción para los 16 HAPs utilizando fibras de PDMS de 100 μm .

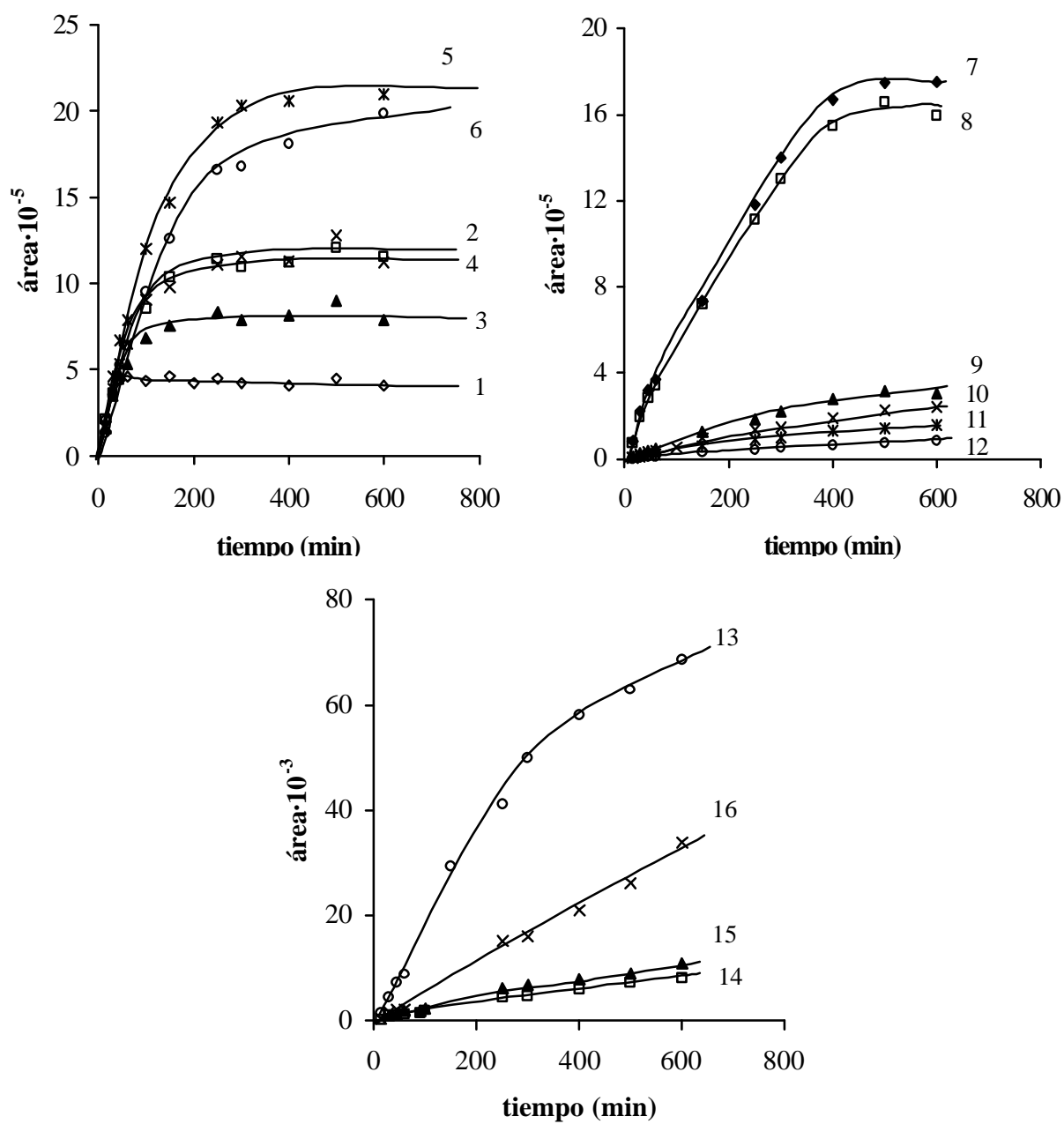


Figura IV.4: Perfiles de tiempos de extracción para los 16 HAPs utilizando fibras de PA de 85 μm .

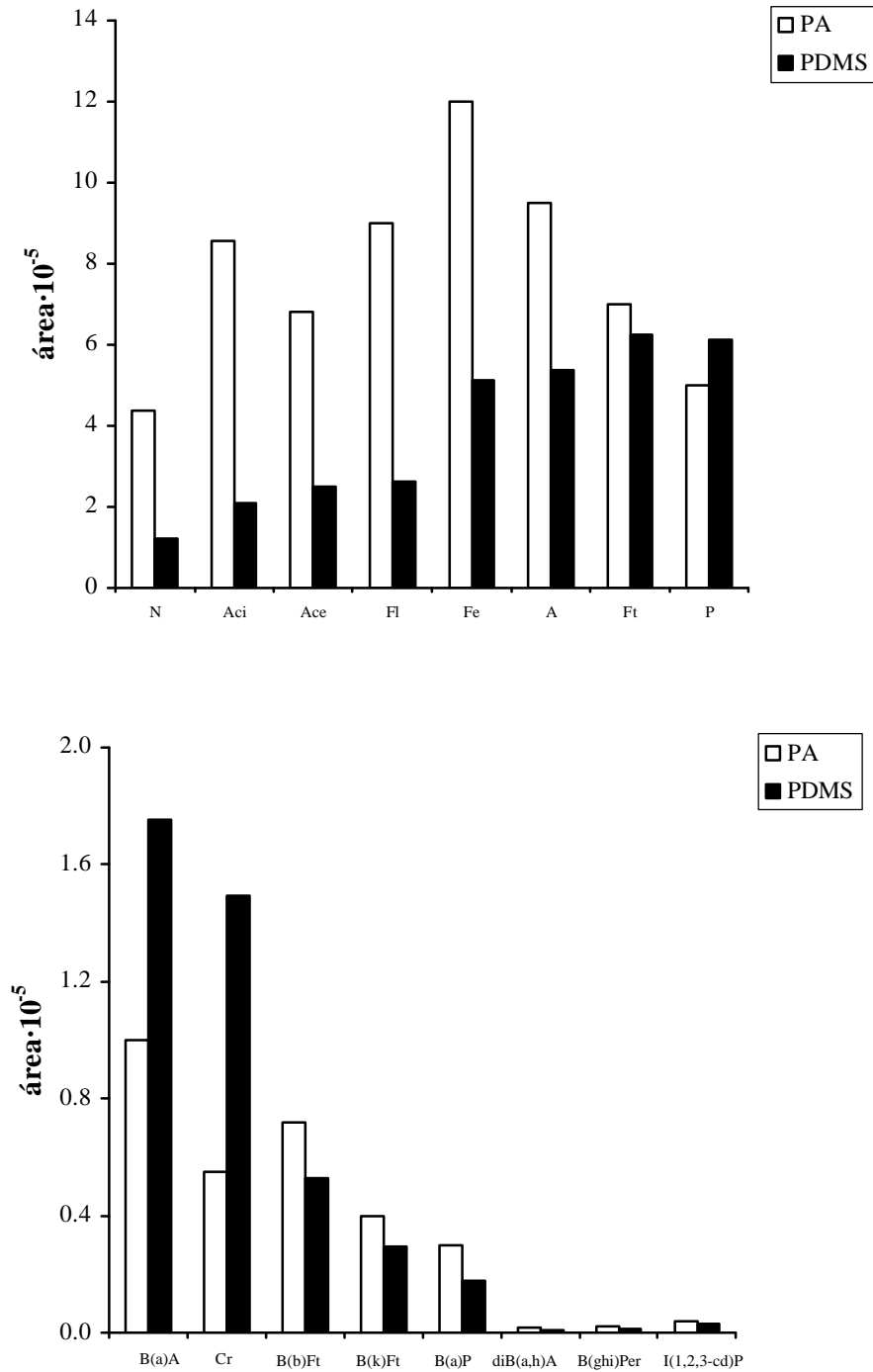


Figura IV.5: Comparación de la eficacia de la extracción, con tiempos de extracción de 100 minutos, expresada como área de pico, para los distintos HAPs a una concentración de 10 ng/mL, utilizando las fibras de: PDMS de 100 μ m y PA de 85 μ m.

IV.3.1.2.- *Linealidad, precisión y límites de detección*

Las determinaciones analíticas utilizadas en los estudios realizados en relación con la microextracción en fase sólida, se basan en el empleo de la Cromatografía de Gases con Espectrometría de Masas como sistema de detección. Al igual que para otros métodos analíticos, es necesario conocer los parámetros de calidad que caracterizan al método, entre los que destacan los siguientes: rango de linealidad, precisión de las determinaciones y límite de detección.

Con objeto de determinar estos parámetros se han realizado un conjunto de experiencias con los dos tipos de fibras empleadas: PDMS y PA, utilizando los tiempos de extracción de 150 y 120 minutos, respectivamente. Las restantes condiciones de operación, así como las condiciones cromatográficas empleadas, son las descritas anteriormente.

- *Rango de linealidad*

Las curvas analíticas se establecieron a partir de disoluciones que contenían cantidades de HAPs comprendidas entre 0.05 y 100 ppb para fibras PDMS y entre 2 y 90 ppb para fibras PA.

Los datos obtenidos con el empleo de cada fibra se muestran en las Tablas IV.4 y IV.5. En general, se observa una buena linealidad en los rangos de concentración empleados, con coeficientes de correlación que oscilan entre 0.986 y 0.999 con la fibra de PDMS, y entre 0.990 y 0.998 con la fibra de PA. Los bajos coeficientes de correlación obtenidos para HAPs como criseno y dibenzo(a,h)antraceno, pueden atribuirse a los tiempos de equilibrio tan largos que presentan estos hidrocarburos.

- *Precisión*

La precisión del método se determinó mediante el análisis de una serie de disoluciones obtenidas mediante extracciones consecutivas de disoluciones acuosas de los HAPs, con una concentración de 60 ng/mL y de 40 ng/mL para las experiencias realizadas con fibras de PDMS

y de PA, respectivamente, empleando las condiciones óptimas establecidas para cada fibra. Los diferentes parámetros estadísticos calculados se encuentran en las Tabla IV.6 y IV.7. Se observa que los resultados muestran que, para un nivel de confianza del 95%, los métodos pueden considerarse correctos y sin error sistemático.

La reproducibilidad se expresa mediante la desviación estándar relativa, obteniéndose valores que oscilan entre 1.04 y 44.0% para la fibra de PDMS. Sin embargo, los menores valores se observan para HAPs con menor número de anillos, siendo en todos los casos superiores a 10% para HAPs con cuatro o más anillos.

Para las fibras de PA, los valores de las RSD oscilan entre 4.43 y 19.9%, encontrándose que con la excepción del indeno(1,2,3,-cd)pireno, pireno y fluoranteno, el resto de HAPs presentan desviaciones estándar relativas próximas al 10% o inferiores.

Aunque el número de extracciones realizadas ha sido de 4 para fibras de PDMS, y 6 para fibras de PA, puede indicarse que, en general, la reproducibilidad es mayor para la fibra de PA.

- Límites de detección

Existen diferentes métodos para calcular el límite de detección. La IUPAC recomienda definir el límite de detección como la concentración cuya señal corresponde a la media del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco. En aquellos casos en los que no es posible llevar a cabo la determinación de un blanco, como es el caso que nos ocupa, una estimación aproximada del límite de detección, se puede calcular de la forma que a continuación se describe: se toman seis alícuotas de una muestra, con concentraciones de analito próximas al valor más bajo del intervalo de linealidad, y se someten al proceso de extracción en las condiciones óptimas establecidas para el método. El valor medio de la señal obtenida (Y_B) y su desviación estándar (S_B) nos permite calcular el límite de detección ($Y = Y_B + 3 \cdot S_B$). Esta expresión no tiene en cuenta la imprecisión del valor de la pendiente y de la ordenada en el origen obtenida en la regresión, aunque sí considera todos los pasos seguidos en el procedimiento completo.

Los límites de detección calculados en el caso de la fibra de PDMS, oscilan entre 0.03 ng/mL para el naftaleno y 54.6 ng/mL para el benzo(ghi)perileno. Con la excepción de los tres hidrocarburos más pesados, los límites de detección varían entre 0.03 y 1.99 ng/mL. Para las fibras con recubrimiento de poliacrilato, los límites de detección son mucho más uniformes que en el caso anterior, y oscilan entre 0.66 y 4.82 ng/mL.

Tabla IV.4.- Parámetros estadísticos de calibración del método analítico usando una fibra de PDMS de 100 μm .

HAP	Pendiente \pm SD	Ord. Origen \pm SD	R ²	S _{y/x}
1. Naftaleno	12675 \pm 264	4749 \pm 13823	0.996	37776
2. Acenaftileno	24332 \pm 819	-24874 \pm 22462	0.991	54562
3. Acenafteno	24218 \pm 643	9192 \pm 21809	0.995	50182
4. Fluoreno	33810 \pm 1017	-36181 \pm 24031	0.994	58165
5. Fenantreno	60828 \pm 1880	-68248 \pm 44428	0.993	107534
6. Antraceno	54911 \pm 1676	-80240 \pm 56682	0.992	142254
7. Fluoranteno	59066 \pm 972	-43917 \pm 32862	0.998	82473
8. Pireno	66593 \pm 1327	-76816 \pm 44868	0.996	112604
9. Benzo(a)antraceno	9971 \pm 247	2922 \pm 8361	0.995	20985
10. Criseno	4771 \pm 253	28341 \pm 10236	0.986	18656
11. Benzo(b)fluoranteno	3482 \pm 47	-2781 \pm 1675	0.999	3856
12. Benzo(k)fluoranteno	2002 \pm 47	1789 \pm 1719	0.997	3872
13. Benzo(a)pireno	1592 \pm 23	-1680 \pm 907	0.998	1831
16. Indeno(1,2,3-cd)pireno	280 \pm 16	-7580 \pm 1759	0.993	2184
14. Dibenzo(a,h)antraceno	53 \pm 4.2	-1532 \pm 502	0.987	502
15. Benzo(ghi)perileno	1135 \pm 55	-61696 \pm 6365	0.995	6685

R: coeficiente de correlación (n=10). S_{y/x}: Error estándar de la estimación.

Tabla IV.5.- Parámetros estadísticos de calibración del método analítico usando una fibra de PA de 85 μm .

HAP	Pendiente \pm SD	Ord. Origen \pm SD	R ²	S _{y/x}
Naftaleno	51131 \pm 1895	-54146 \pm 77458	0.992	160797
Acenaftileno	109357 \pm 2692	-89413 \pm 113573	0.997	228279
Acenafteno	63142 \pm 2774	100939 \pm 93249	0.994	157656
Fluoreno	90273 \pm 1806	-86987 \pm 69801	0.998	142539
Fenantreno	143873 \pm 4591	-366454 \pm 209186	0.996	364727
Antraceno	128993 \pm 5854	-501484 \pm 266728	0.992	465055
Fluoranteno	65679 \pm 1339	-184020 \pm 61027	0.998	106404
Pireno	66168 \pm 1937	-197187 \pm 88277	0.996	153916
Benzo(a)antraceno	6077 \pm 253	-5099 \pm 9694	0.991	18345
Criseno	2063 \pm 103	19764 \pm 2795	0.992	3628
Benzo(b)fluoranteno	2279 \pm 63	-844 \pm 1666	0.997	3214
Benzo(k)fluoranteno	1054 \pm 52	-1539 \pm 1677	0.990	2669
Benzo(a)pireno	948 \pm 38	-692 \pm 1089	0.992	2102
Indeno(1,2,3-cd)pireno	256 \pm 8.9	-39.6 \pm 251	0.995	433
Dibenzo(a,h)antraceno	186 \pm 7.47	-847 \pm 233	0.995	286
Benzo(ghi)perileno	203 \pm 8.2	-99 \pm 258	0.992	491

Tabla IV.6.- Parámetros de calidad del método analítico usando fibras de PDMS.

HAP	Media	S	RSD (%)	t_{exp}	t'_{exp}	LOD(ng/mL)
Naftaleno	59.0	2.87	4.86	0.35	0.70	0.03
Acenaftileno	59.6	0.62	1.04	0.64	1.29	1.12
Acenafteno	59.8	1.04	1.74	0.19	0.39	0.08
Fluoreno	61.5	1.07	1.74	1.40	2.81	1.28
Fenantreno	61.6	5.34	8.66	0.31	0.62	1.18
Antraceno	63.3	8.03	12.7	0.41	0.82	1.61
Fluoranteno	60.9	4.33	7.10	0.22	0.45	1.44
Pireno	59.5	6.62	11.1	0.08	0.15	1.66
Benzo(a)antraceno	61.6	8.12	13.2	0.20	0.39	0.07
Criseno	54.4	9.33	17.1	0.60	1.19	0.12
Benzo(b)fluoranteno	59.8	1.01	16.9	0.02	0.03	1.99
Benzo(k)fluoranteno	55.0	1.47	26.7	0.34	0.68	0.04
Benzo(a)pireno	63.6	1.85	29.1	0.20	0.39	1.59
Indeno(1,2,3-cd)pireno	63.6	9.61	15.1	0.37	0.74	27.9
Dibenzo(a,h)antraceno	69.2	3.05	44.1	0.30	0.60	29.9
Benzo(ghi)perileno	59.4	12.5	18.0	0.05	0.10	54.6

 $t_{0.05,4} = 3.18$

Tabla IV.7.- Parámetros de calidad del método analítico usando fibras de PA.

HAP	Media	S	RSD(%)	t_{exp}	t'_{exp}	LOD(ng/mL)
Naftaleno	38.1	1.85	4.85	1.02	2.50	1.21
Acenaftileno	40.7	3.34	8.21	0.21	0.51	1.38
Acenafteno	40.2	2.22	5.52	0.07	0.17	1.27
Fluoreno	37.3	2.72	7.28	0.98	2.39	1.71
Fenantreno	40.3	4.62	11.5	0.06	0.14	3.26
Antraceno	39.7	4.81	12.1	0.07	0.18	4.82
Fluoranteno	42.7	8.31	19.4	0.32	0.79	4.18
Pireno	40.3	8.00	19.8	0.04	0.09	5.55
Benzo(a)antraceno	39.2	4.28	10.9	0.18	0.45	3.39
Criseno	41.7	3.13	7.51	0.54	1.32	1.43
Benzo(b)fluoranteno	38.7	1.78	4.59	0.71	1.75	0.66
Benzo(k)fluoranteno	38.5	3.07	7.97	0.49	1.20	4.50
Benzo(a)pireno	38.6	1.39	3.60	1.05	2.56	4.79
Indeno(1,2,3-cd)pireno	42.6	8.46	19.9	0.31	0.75	1.55
Dibenzo(a,h)antraceno	39.9	1.77	4.43	0.03	0.08	4.62
Benzo(ghi)perileno	39.8	3.99	10.0	0.04	0.12	1.75

$$t_{0.05,6} = 2.57$$

IV.3.2.- INFLUENCIA DE LOS MEDIOS MICELARES EN LA SEPARACIÓN DE HAPs POR SPME

Es conocido que diversos surfactantes, a concentraciones superiores a su concentración micelar crítica, provocan aumentos de la solubilidad aparente en agua de muchos compuestos orgánicos hidrofóbicos. En relación con la microextracción en fase sólida se ha publicado un trabajo [235], en el que se estudia de forma cualitativa la influencia de la adición de surfactantes en el aumento de solubilidad y en la eficacia de la extracción de HAPs presentes en suelos.

Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios sistemáticos en los que se intente establecer la influencia de los medios micelares sobre la extracción de un número considerable de HAPs, de especial significación medioambiental, mediante el empleo de microextracción en fase sólida.

Con tal finalidad, se han utilizado medios micelares catiónicos, aniónicos y no-iónicos, constituidos por los surfactantes: bromuro de cetiltrimetilamonio, lauril sulfato sódico y polioxietilen-10-lauriléter, cuyas características se muestran en la Tabla IV.8. En cuanto a la microextracción en fase sólida, con objeto de obtener resultados comparables, se han utilizado las mismas fibras, de polidimetilsiloxano y de poliacrilato, que las empleadas en los apartados anteriores dentro de los estudios en medios acuosos.

Tabla IV.8.- Características de los surfactantes utilizados.

Nombre	Fórmula	cmc (M)	N
Bromuro de cetiltrimetilamonio	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$	$9.2 \cdot 10^{-4}$	61
Lauril sulfato sódico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}^+$	$8.1 \cdot 10^{-3}$	62
Polioxietilen-10-lauriléter	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{10}\text{OH}$	$1 \cdot 10^{-4}$	-

Para llevar a cabo los estudios relacionados con la influencia de los medios micelares en la eficacia de la retención de HAPs sobre recubrimientos de PDMS y de PA, se han utilizado concentraciones fijas de 30 ng/mL para cada uno de los HAPs, y concentraciones variables de surfactante, siempre superiores a su cmc. Los intervalos de concentración estudiados, para cada surfactante, son los siguientes:

POLE: 0.01 a 2.20% (p/v)

LSS: 2 a 8% (p/v)

CTAB: 1 a 6% (p/v)

y la microextracción se realiza en condiciones similares a las descritas en ausencia de surfactante. El tiempo de extracción empleado para cada fibra fue el optimizado en ausencia de surfactante: 150 min para el recubrimiento de polidimetilsiloxano y 120 min para el de poliacrilato. La eficacia de la extracción viene expresada por el área de pico cromatográfico, para un analito concreto.

Las Figuras IV.6 a IV.11 muestran los resultados obtenidos en la extracción de los dieciséis HAPs con cada uno de los surfactantes y para cada una de las fibras utilizadas. En todos los casos, se observa una disminución exponencial de la eficacia de la extracción, a medida que aumenta la concentración de surfactante en la disolución. Esta variación de la eficacia es diferente para cada una de las fibras y depende considerablemente de la naturaleza del surfactante utilizado.

La observación de los resultados agrupados en las citadas figuras pone de manifiesto algunas tendencias. Así, para ambas fibras:

- La eficacia de la extracción disminuye, de forma general, al aumentar el peso molecular de los HAPs y, en todo caso, al hacerlo el número de anillos aromáticos condensados.
- El surfactante no-iónico empleado es el que permite obtener mayores eficacias en la extracción de los HAPs. Entre los medios micelares iónicos, el de naturaleza catiónica es el que provoca mayores disminuciones en la eficacia.

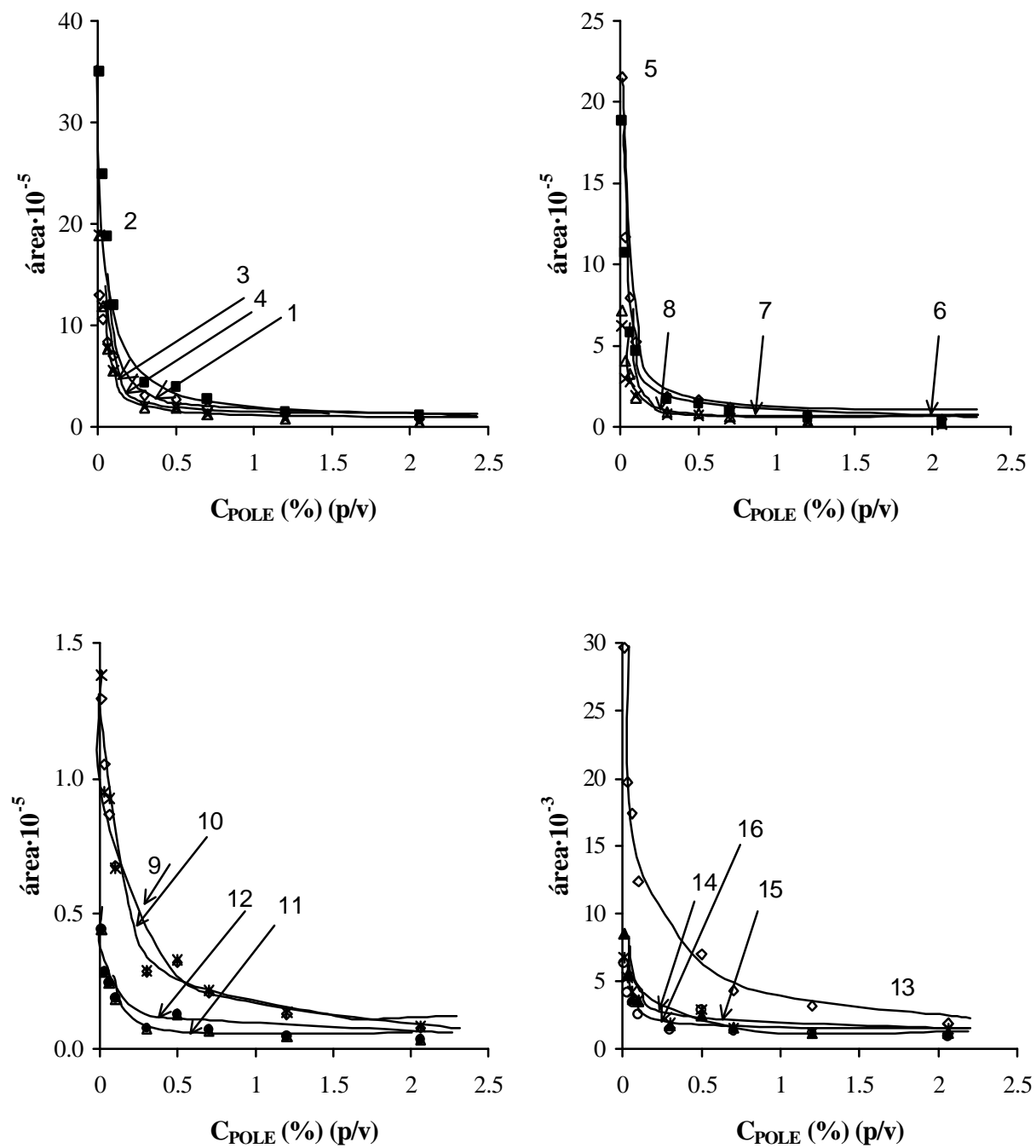


Figura IV.6: Efecto de la presencia de POLE en la microextracción de HAPs con una fibra de PA de 85 μm .

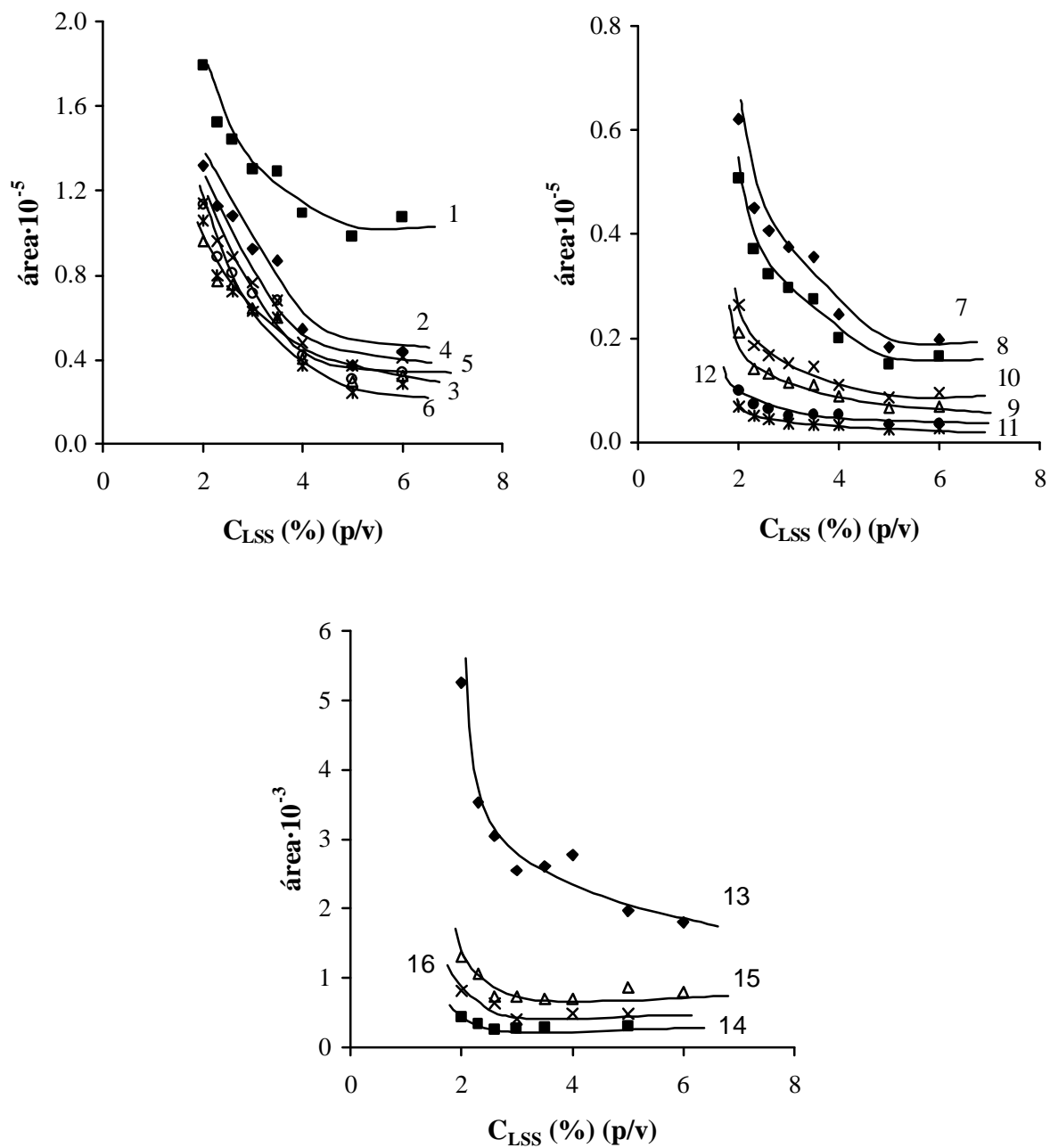


Figura IV.7: Efecto de la presencia de LSS en microextracción de HAPs con una fibra de PA de 85 μm .

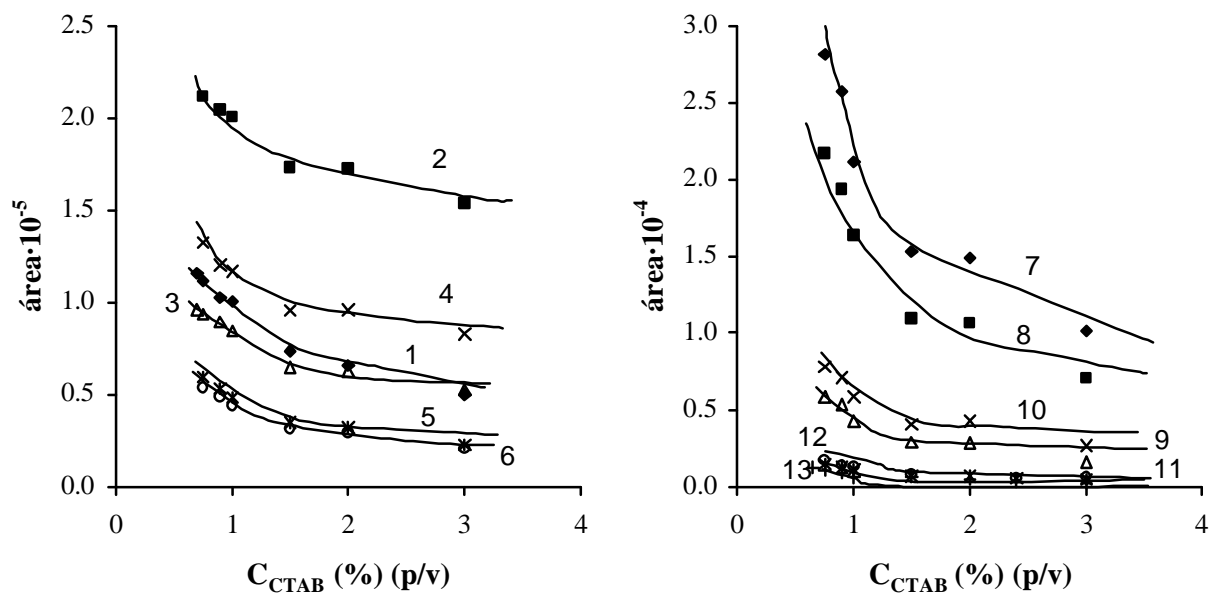


Figura IV.8: Efecto de la presencia de CTAB en la microextracción de HAPs con la fibra de PA de 85 μm .

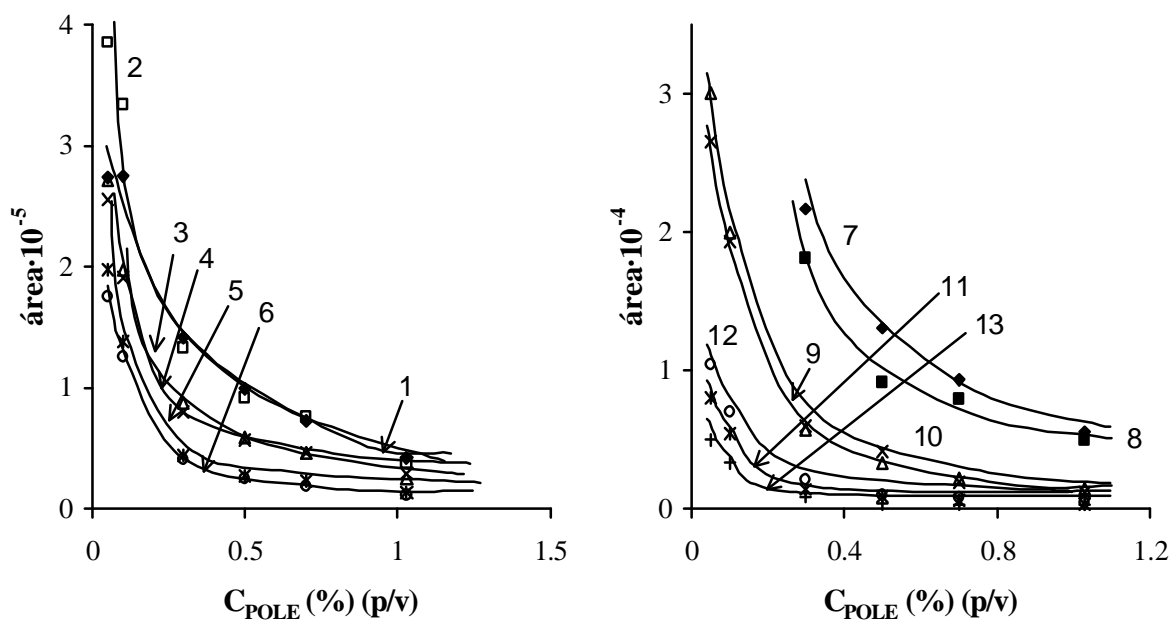


Figura IV.9: Efecto de la presencia de POLE en la microextracción de HAPs con la fibra de PDMS de 100 μm .

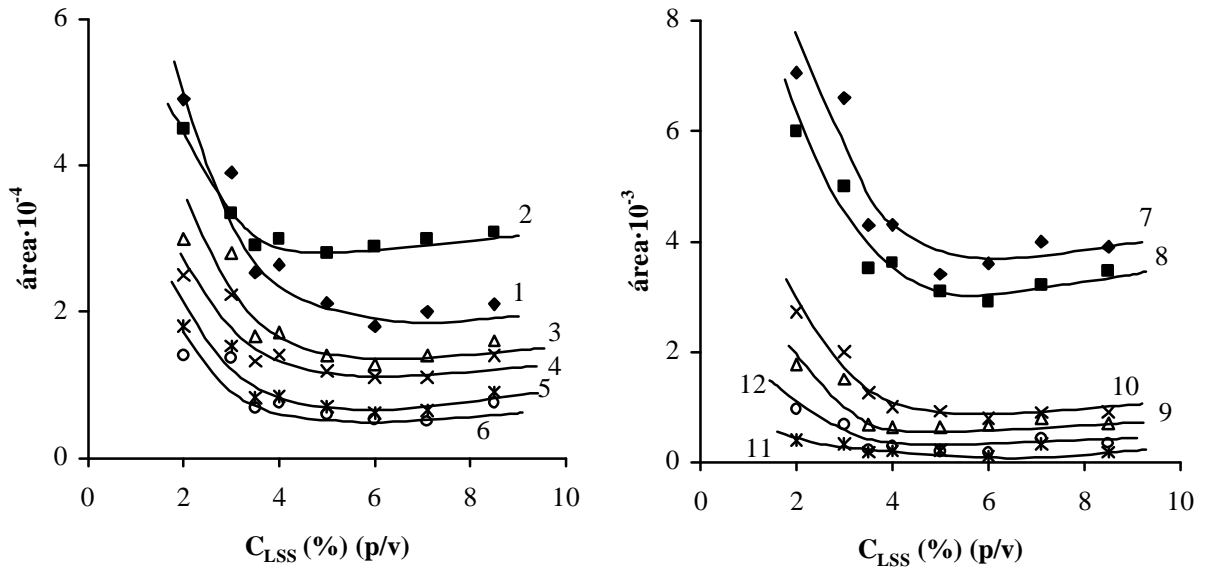


Figura IV.10: Efecto de la presencia de LSS en la microextracción de HAPs con la fibra de PDMS de 100 μm .

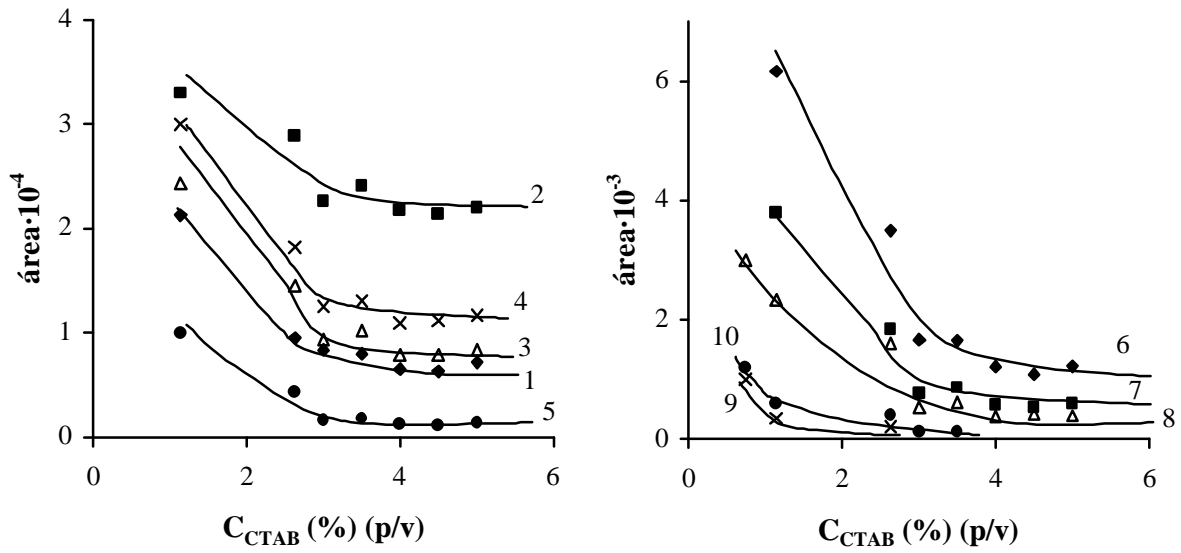


Figura IV.11: Efecto de la presencia de CTAB en la microextracción de HAPs con la fibra de PDMS de 100 μm .

En cuanto a la influencia de la naturaleza del recubrimiento de las fibras, en presencia de cualquiera de los surfactantes, las fibras de poliacrilato son las que conducen a mayores eficacias. Con la fibra de PDMS y utilizando disoluciones de CTAB, los hidrocarburos más pesados y, en especial, el indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno y benzo(ghi)perileno, prácticamente no llegan a detectarse, al menos con los tiempos de extracción utilizados en las distintas experiencias.

Los resultados expuestos deben encontrar explicación en los diferentes tipos de interacciones a que se ven sometidos los HAPs. Cuando se utilizan disoluciones en las que la concentración de surfactante es superior a su concentración micelar crítica, puede admitirse que, después de transcurrir un cierto tiempo, la cantidad de surfactante retenida por el recubrimiento de la fibra es prácticamente constante. En estas condiciones, los solutos pueden verse sometidos a diferentes equilibrios de distribución, con participación de la fase acuosa, de la fase micelar, del surfactante adherido a la fibra, y de la fase estacionaria polimérica. La distribución de los solutos en las diferentes fases depende, entre otros factores, de la concentración micelar en disolución y, por supuesto, de la naturaleza de las fases implicadas, que controlan las constantes de asociación soluto-micela y las constantes de reparto entre las distintas fases.

En la bibliografía se encuentran constantes de asociación soluto-micela, para distintos surfactantes, y para la mayoría de los HAPs [252] utilizados en este estudio. En general, atendiendo a la naturaleza de los surfactantes, dichas constantes disminuyen en el siguiente orden:

CTAB > LSS > surfactantes no iónicos

En consecuencia, si atendemos a los resultados obtenidos, puede establecerse, en principio, que la eficacia de la microextracción en fase sólida para HAPs disueltos en un medio micelar, aumenta al disminuir la fuerza de las interacciones que tienen lugar entre los HAPs y los medios micelares.

Las Figuras IV.12 y IV.13 permiten visualizar, a efectos comparativos, para cada una de las fibras empleadas, la eficacia de la extracción de los HAPs, expresada como área de pico cromatográfico, para los hidrocarburos inicialmente disueltos en medios acuosos o en presencia de sistemas micelares catiónicos, aniónicos o no-iónicos.

Se observa que, en general, los medios micelares provocan descensos importantes de los rendimientos de las extracciones. No obstante, la consideración de los equilibrios antes citados, permite prever que se pueden mejorar los resultados expuestos mediante variaciones en las concentraciones de los surfactantes o, mejor, introduciendo modificaciones experimentales que provoquen variaciones en las constantes de equilibrio.

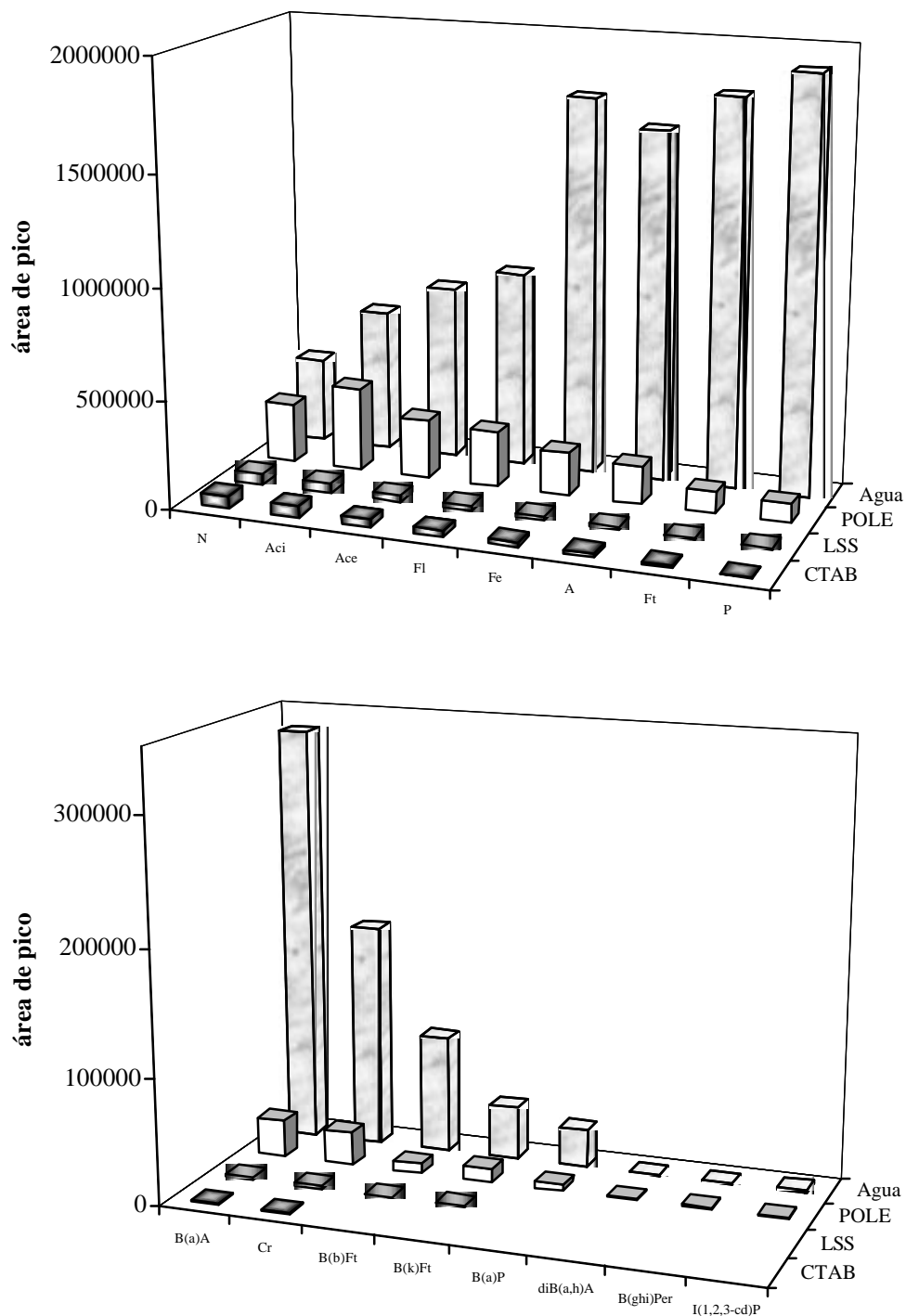


Figura IV.12: Eficacia de la extracción de HAPs, en diferentes medios, con fibras de PDMS de 100 μm . $C_{\text{HAPs}} = 30 \text{ ppb}$; $C_{\text{POLE}} = 0.05\% \text{ (p/v)}$; $C_{\text{LSS}} = 2\% \text{ (p/v)}$; $C_{\text{CTAB}} = 0.7\% \text{ (p/v)}$.

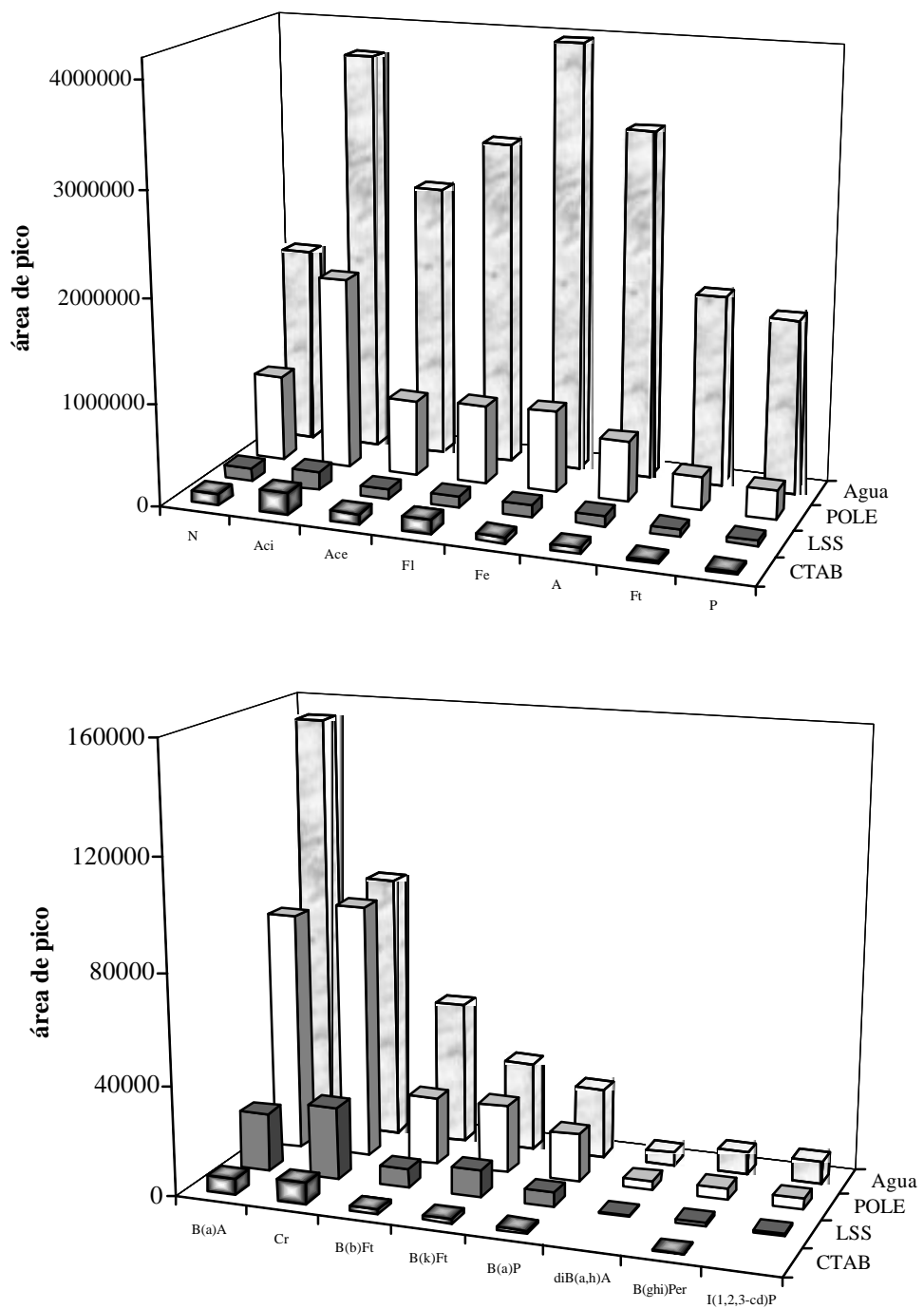


Figura IV.13: Eficacia de la extracción de HAPs, en diferentes medios, con fibras de PA de 85 μm .

$C_{\text{HAPs}} = 30 \text{ ppb}$; $C_{\text{POLE}} = 0.05\% \text{ (p/v)}$; $C_{\text{LSS}} = 2\% \text{ (p/v)}$; $C_{\text{CTAB}} = 0.7\% \text{ (p/v)}$.

IV.3.3.- MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE CONSTANTES DE INTERACCIÓN SOLUTO-MICELA

Aunque la microextracción en fase sólida ha encontrado una aceptación considerable para la determinación de compuestos orgánicos en diversas matrices, también es posible la aplicación de esta técnica para el cálculo de coeficientes de distribución (K_{fs}) de algunos solutos. En este sentido, destacan los trabajos en que se describe la determinación de constantes de distribución de algunos HAPs, con hidrofobicidad entre moderada y alta [251], PCBs y alcanos [226], entre disoluciones acuosas y diversas fases poliméricas. La microextracción en fase sólida también se ha utilizado para establecer los coeficientes de reparto de compuestos como fenoles o hidrocarburos aromáticos policíclicos, en agua, y sustancias orgánicas poliméricas disueltas [224, 253].

Con estos precedentes, nos ha parecido de interés extender la utilización de la microextracción en fase sólida al cálculo de constantes de asociación soluto-micela, en base a la disminución ya comentada de la eficacia de la microextracción de HAPs en disoluciones de surfactantes a concentraciones superiores a su concentración micelar crítica. El cálculo de estas constantes es de indudable importancia para la interpretación de procesos, así como para realizar previsiones acerca de la influencia que pueden ejercer determinadas variables experimentales en los equilibrios de asociación y distribución, en los que participan los solutos disueltos en medios micelares.

De acuerdo con Pawliszyn y col. [224,253], en una muestra con varios componentes, fases verdaderas o pseudofases, $i= 1,2,3,\dots$, la concentración del analito estudiado (m) en una fase (i) puede escribirse:

$$C_i = \frac{n_m}{V_i + \sum_{j \neq i} V_j K_{i,j,m}} \quad [\text{IV.4}]$$

donde n_m es la cantidad total de analito en la muestra, $K_{ij,m}$ es el coeficiente de reparto del soluto (m) entre los componentes i y j ($K_{ij,m} = C_{i,m}/C_{j,m}$) y V_i es el volumen de componente i. El volumen V_j puede ser reemplazado por número de moles, masa o área superficial, si el componente de la muestra viene mejor expresado en estos términos, tomando $K_{ij,m}$ en las unidades que correspondan.

Si se supone una muestra formada por agua y otra fase, como un medio micelar, en ausencia de la fibra, la concentración libre de analito (m) en agua (ac) una vez alcanzado el equilibrio, podría expresarse como:

$$C_{ac,m} = \frac{n_m}{V_{ac} + m_M \cdot K_{M,m}} \quad [IV.5]$$

asumiendo que la concentración de analito en el espacio en cabeza es despreciable. V_{ac} es el volumen de la fase acuosa, m_M es la cantidad de surfactante expresado en moles, n_m es la cantidad total de analito, también expresado en moles y $K_{M,m}$ es el coeficiente de reparto del analito entre el medio micelar y el agua, usualmente definido como $K_{M,m} = C_{m \text{ en } M}/C_{m \text{ en } \text{agua}}$, y viene expresado en L/mol si $C_{m \text{ en } M}$ viene expresado en mol/mol y $C_{m \text{ en } \text{agua}}$ en mol/L.

En presencia de la fibra, la concentración libre en equilibrio podría ser:

$$C'_{ac,m} = \frac{n_m}{V_{ac} + m_M \cdot K_{M,m} + V_F \cdot K_{F,m}}$$

donde V_F es el volumen de la fibra y $K_{F,m}$ es el coeficiente de reparto del soluto entre la fibra y el agua. Así, la relación entre la concentración libre del analito en ausencia de la microfibrilla ($C_{ac,m}$) y en su presencia ($C'_{ac,m}$) es:

$$\frac{C_{ac,m}}{C'_{ac,m}} = 1 + \frac{V_F \cdot K_{F,m}}{V_{ac} + m_M K_{M,m}}$$

Para la utilización de las ecuaciones anteriores, una aproximación útil resulta si se admite que al producirse la retención del soluto por la fibra, no se modifica su concentración en disolución de forma apreciable. En tal sentido, se puede considerar que la aproximación se cumple siempre que al establecerse la distribución en presencia de la fibra la concentración del analito en agua disminuya menos de un 10%. Es decir, si se cumple que:

$$\frac{V_F K_{F,m}}{V_{ac} + m_M K_{M,m}} < \frac{1}{0.9} - 1 = 0.111$$

Como quiera que el término, $m_M K_{M,m}$, suele ser desconocido, se puede comprobar que el criterio expuesto se cumple si se verifica la siguiente desigualdad:

$$K_{F,m} < \frac{V_{ac}}{10V_F}$$

De acuerdo con los datos bibliográficos [204,251], esta condición se satisface para los HAPs, incluidos los más hidrofóbicos. En consecuencia, puede admitirse que la microextracción en fase sólida puede extraer estos hidrocarburos disueltos en medio micelar, con un volumen suficiente de agua, sin que cambie de forma significativa la concentración de los HAPs en el medio acuoso.

De acuerdo con dicha aproximación, la ecuación [IV.5] puede reordenarse, de forma que la concentración total del analito ($C_{total, m}$) y la concentración del analito libre ($C_{ac, m}$) queden relacionadas mediante un factor en el que interviene la constante de asociación soluto-micela y la concentración de surfactante en disolución, según indica la siguiente ecuación:

$$C_{total, m} = C_{ac, m} \left[1 + K_{M,m} \frac{m_M}{V_{ac}} \right]$$

y reagrupando términos:

$$\frac{1}{C_{ac,m}} = \frac{1}{C_{total,m}} + \frac{K_{M,m}}{C_{total,m}} C_M \quad [IV.6]$$

Así, la representación gráfica de los valores $1/C_{ac,m}$ frente a la concentración de surfactante en el medio, debe conducir a líneas rectas, cuyas pendientes permitirán el cálculo de constantes de asociación soluto-micela. Para establecer los valores de $C_{ac,m}$ se recurre a la microextracción en fase sólida, y a las curvas de calibrado obtenidas con los HAPs disueltos en agua. En la utilización de las ecuaciones anteriores se asume que el analito extraído por las fibras sólo procede de la fase acuosa, y que la concentración de micelas puede sustituirse por la concentración de surfactante en disolución.

En los cálculos indicados sólo se ha tomado en consideración los HAPs que alcanzan el equilibrio en los tiempos de extracción prefijados: 120 min y 150 min para las fibras de PA y de PDMS respectivamente, utilizando un medio micelar de POLE.

La Figura IV.14 muestra las rectas obtenidas al representar la inversa de la concentración de hidrocarburo libre frente a la concentración de POLE, para la fibra de PA, de acuerdo con la ecuación IV.6. Los valores de las ordenadas en el origen, y de las pendientes, para cada uno de los HAPs considerados, y para cada una de las fibras empleadas, se han agrupado en las Tablas IV.9 y IV.10, junto con los coeficientes de correlación correspondientes a las referidas rectas y las constantes de asociación HAPs-POLE calculadas.

En todos los casos se obtienen ordenadas en el origen muy próximas a los valores teóricos, correspondientes a la inversa de la concentración inicial para cada uno de los HAPs, excepto para el antraceno y el fluoranteno con la utilización de la fibra de polidimetilsiloxano. Por otra parte, y en general, los valores de $K_{M,m}$ obtenidos para los dos tipos de fibra pueden considerarse concordantes.

En distintos estudios, se ha puesto de manifiesto que las constantes de asociación soluto-micela, para distintas sustancias, pueden resultar útiles para estimar relaciones entre estructuras químicas y las propiedades hidrofóbicas de moléculas bioactivas [254,255], que son de notable

interés en estudios medioambientales, toxicológicos y farmacológicos [256-258]. La consideración de las micelas como estructuras asimilables a las biomembranas, justificaría dichas relaciones.

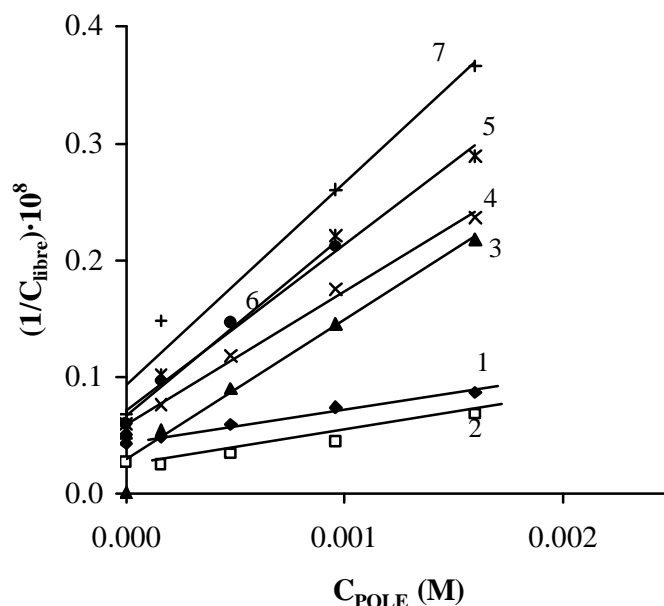


Figura IV.14: Rectas obtenidas al representar la inversa de la concentración de hidrocarburo libre frente a la concentración de POLE, de acuerdo con la ecuación [IV.6], correspondiente a la fibra de PA.

Tabla IV.9.- Constantes de asociación HAP-POLE determinadas con la utilización de la SPME con recubrimiento de poliacrilato.

HAP	Ord. Origen·10 ⁻⁶	Pendiente·10 ⁻⁹	R ²	K _{M,m}
Naftaleno	4.929	1.937	0.997	454
Acenaftileno	2.024	3.051	0.995	1144
Acenafteno	4.275	10.80	0.993	2100
Fluoreno	5.937	11.39	0.995	2050
Fenantreno	7.156	14.18	0.986	2380
Antraceno	6.631	15.54	0.991	2600
Fluoranteno	9.263	17.37	0.972	2580

Tabla IV.10.- Constantes de asociación HAP-POLE determinadas con la utilización de la SPME con recubrimiento de polidimetilsiloxano.

HAP	Ord Origen·10 ⁻⁶	Pendiente·10 ⁻⁹	R ²	K _{M,m}
Naftaleno	4.215	1.707	0.995	400
Acenaftileno	3.171	1.704	0.997	638
Acenafteno	6.553	8.463	0.999	1640
Fluoreno	9.453	8.380	0.968	1510
Fenantreno	9.753	29.21	0.926	4900
Antraceno	30.24	10.51	0.999	1760
Fluoranteno	66.22	24.32	0.997	3600

En tal sentido, nos ha parecido de interés comprobar la extensión en la cual las constantes de asociación HAPs-POLE, calculadas como se acaba de indicar, guardan relación con parámetros representativos de la hidrofobicidad de estos hidrocarburos, como son los coeficientes de reparto (LogP) octanol-agua [259], o con descriptores topológicos y geométricos de las estructuras de cada uno de los HAPs indicados [259,260], como son los siguientes:

F: Factor de correlación, que se calcula, para cualquier hidrocarburo, mediante la expresión:

$$F = (\text{n}^\circ \text{ de dobles enlaces}) + (\text{n}^\circ \text{ de átomos de carbono primarios y secundarios}) - 0.5 \text{ (por cada anillo aromático)}$$

c: Índice de conectividad molecular. Representa el tamaño topológico de las moléculas y su grado de ramificación.

n_p: Número de electrones π en la molécula.

Entre los descriptores geométricos se ha elegido V_w , siendo:

V_w : Volumen de Van der Waals, calculado a partir de los radios de Van der Waals de los átomos que componen la molécula,

cuyos valores, referidos a aquellos HAPs para los que ha sido posible el cálculo de la constante interacción soluto-micela, se han agrupado en la Tabla IV.11.

Tabla IV.11.- Valores correspondientes a los descriptores para los HAPs estudiados.

HAP	F	c	n_p	V_w	LogP
Naftaleno	5.0	3.4	10	73.96	2.657
Acenaftileno	5.5	4.1	12	83.44	2.058
Acenafteno	6.5	4.4	10	87.78	3.322
Fluoreno	6.5	4.6	12	93.67	3.312
Fenantreno	7.0	4.8	14	99.56	3.377
Antraceno	7.0	4.8	14	99.56	3.415
Fluoranteno	8.0	5.6	16	109.0	3.412

De obtenerse correlaciones con una elevada significación, podríamos disponer de un nuevo método, basado en la microextracción micelar y la CG-MS, para la estimación de dichos parámetros, que presentaría ventajas con respecto a las convencionales [261,262].

En la Figura IV.15 se han agrupado las gráficas obtenidas al representar los distintos descriptores frente a $K_{M,m}$ o $\log K_{M,m}$. Los coeficientes de correlación varían entre 0.76 y 0.93, que corresponden a las rectas coeficiente de reparto octanol-agua y $\log K_{M,m}$ y volumen de Van der Waals y $K_{M,m}$, respectivamente.

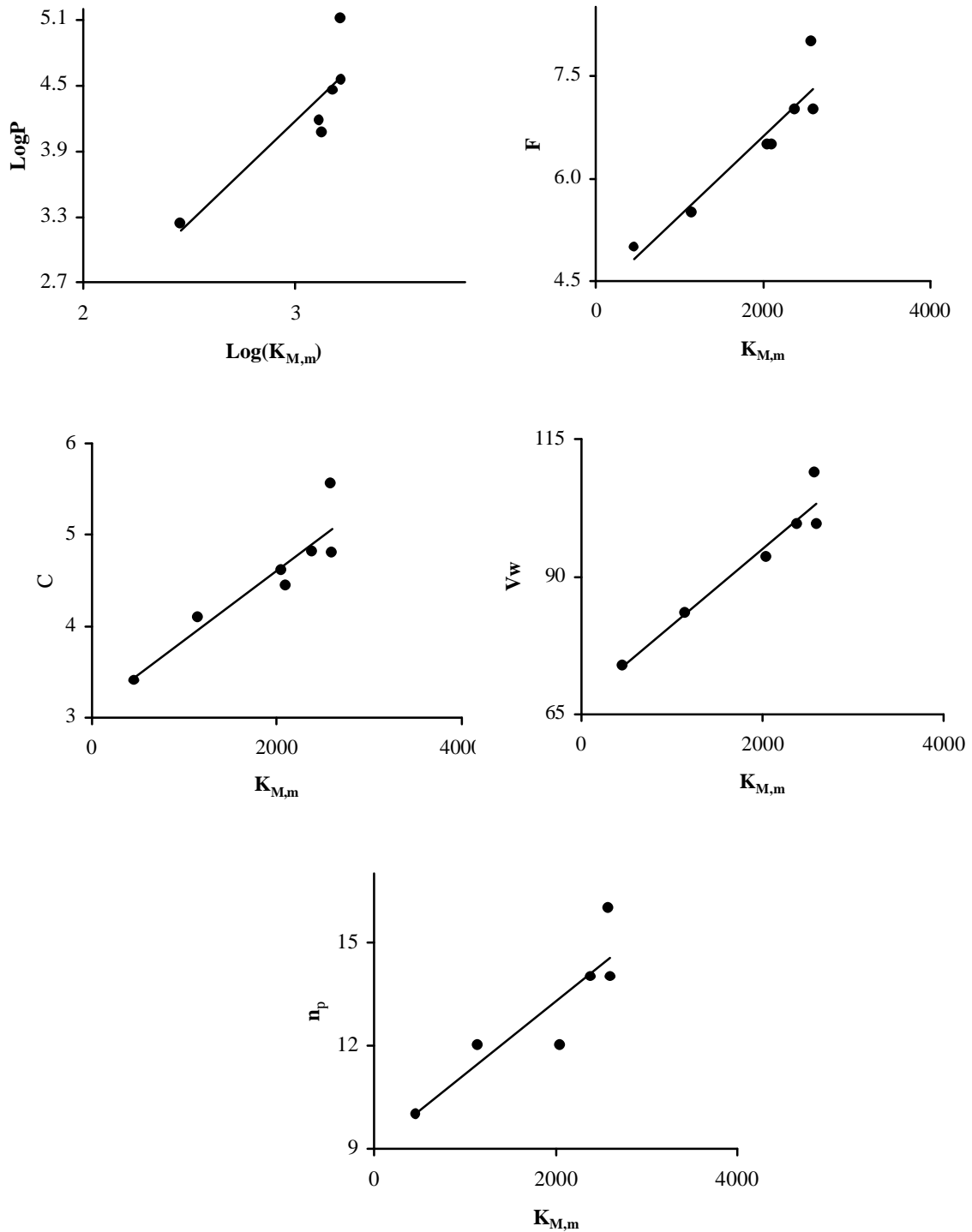


Figura IV.15: Correlaciones entre las constantes de asociación HAPs-POLE, obtenidas a partir de los estudios con la fibra de PA, y diferentes descriptores de los hidrocarburos.

Estas relaciones permiten establecer, a pesar del reducido número de hidrocarburos estudiados, que la microextracción en fase sólida podría constituir una técnica alternativa a otras ya existentes para la determinación de constantes de asociación soluto-micela.

IV.3.4.- MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA MICELAR-CROMATOGRAFÍA DE GASES-MASAS PARA LA DETERMINACIÓN DE HAPs

La microextracción en fase sólida ha encontrado sus principales aplicaciones en la extracción de compuestos orgánicos disueltos en un medio acuoso. La escasa solubilidad en agua de muchas sustancias constituye una limitación importante de la técnica. Aunque es posible trabajar con disoluciones que contienen disolventes orgánicos, su presencia repercute negativamente en la capacidad de las fibras para retener solutos.

Se ha comentado con anterioridad las características positivas que presentan los medios micelares, especialmente como solubilizantes de sustancias de diversa polaridad. La eficacia demostrada por las disoluciones de POLE, a concentraciones superiores a su cmc, en la extracción de HAPs contenidos en sedimentos marinos, aplicando microondas o ultrasonidos, evidencia el aumento de solubilidad que experimentan dichos hidrocarburos en presencia de este medio micelar.

Según se ha puesto de manifiesto en el apartado IV.3.2., los medios micelares provocan descensos importantes en la eficacia de la extracción de HAPs mediante la extracción con fibras recubiertas de polidimetilsiloxano o de poliacrilato, si bien, cuando el medio micelar es de POLE, son extraíbles cantidades de HAPs que pueden ser cuantificadas perfectamente por cromatografía de gases.

En atención a lo expuesto, en este apartado se desarrolla un nuevo método para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, después de ser extraídos desde un medio micelar de POLE, con una microfibra de poliacrilato y sometidos a desorción en CG-MS. La metodología establecida se ha utilizado para determinar el contenido de un conjunto de HAPs

presentes en un sedimento marino.

Con las experiencias realizadas en este apartado, la técnica de microextracción en fase sólida, utilizada para analitos disueltos en medios acuosos, se extiende a solutos presentes en medios micelares, con lo que podríamos referirnos a una nueva modalidad de la técnica, que podría denominarse microextracción en fase sólida micelar. De esta forma, se podría ampliar, de forma considerable, el número y naturaleza de las sustancias susceptibles de ser incorporadas a un sistema cromatográfico mediante el empleo de microfibras.

IV.3.4.1.- *Determinación de HAPs presentes en un medio micelar de POLE, después de su extracción por SPME*

En base a los resultados obtenidos en los apartados anteriores, para establecer las características analíticas de un método que nos permita la determinación de mezclas de hidrocarburos aromáticos policíclicos, disueltos en un medio micelar de POLE, basado en su extracción por SPME, se han utilizado fibras recubiertas de poliacrilato. En cuanto a parámetros experimentales, como el tiempo de extracción, el tiempo de desorción y las condiciones para la separación y cuantificación en el sistema constituido por el cromatógrafo de gases y el detector de espectrometría de masas, se han mantenido los optimizados en apartados anteriores.

La naturaleza y concentración del surfactante utilizado para formar el medio micelar vienen condicionadas por la participación del surfactante en nuestro caso, previa a la microextracción en fase sólida, en la solubilización-separación de los HAPs inicialmente presentes en muestras de sedimentos marinos. En tal sentido, tanto la extracción asistida por microondas como la que utiliza ultrasonidos se han efectuado con la utilización de POLE.

Por otra parte, el medio micelar ejerce una influencia importante en la eficacia de la extracción de los HAPs por SPME. En consecuencia, al establecer las características del método analítico, es necesario escoger la concentración adecuada de POLE, que, al tiempo de garantizar la separación de los HAPs contenidos en el sedimento, permita, por otra parte, alcanzar la mejor sensibilidad. Por consiguiente, debe llegarse a una solución de compromiso.

Tomando en consideración las concentraciones optimizadas de POLE para la separación de HAPs presentes en sedimentos, 6.26% (p/v) cuando se utilizan ultrasonidos, y 1.25% (p/v) para la separación asistida por microondas; además del volumen de surfactante a utilizar y el volumen de disolución que se puede recuperar después de filtrar la suspensión de sedimento una vez realizada la extracción, se deduce que la concentración mínima de POLE en la disolución, a partir de la que se separan los HAPs con la microfibras, sería de 0.88% (p/v). En todo caso, la dependencia de la eficacia de la extracción con la concentración de surfactante obliga a que la concentración del surfactante en muestras y patrones coincida.

La Figura IV.16 muestra los perfiles de los tiempos de extracción para los 16 HAPs en estudio, en presencia de un medio micelar de POLE. Dichos perfiles se establecieron realizando medidas de áreas de pico cromatográfico para cada hidrocarburo, como una función del tiempo de exposición de la fibra. Las fibras de PA se introducen en disoluciones micelares con 0.88% (p/v) de POLE conteniendo patrones de HAPs con una concentración de 10 ng/mL.

A partir de los resultados obtenidos, pueden establecerse los siguientes tiempos mínimos de equilibrio: 30 min para el naftaleno, 45 min para el acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno y antraceno, 100 min para el fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno y criseno, 200 min para el benzo(b)fluoranteno y benzo(k)fluoranteno. El benzo(a)pireno presenta tiempos de equilibrio en torno a los 300 min, mientras que hidrocarburos como el dibenzo(a,h)antraceno, el indeno(1,2,3-cd)pireno y el benzo(ghi)perileno presentan tiempos de equilibrio superiores a 400 min, tiempo hasta el cual se prolongaron las experiencias.

Los tiempos de equilibrio obtenidos resultan ser tres veces inferiores a los obtenidos en ausencia de un medio micelar. Para el tiempo de extracción fijado, 120 min, diez de los dieciséis HAPs estudiados han alcanzado el equilibrio

En la Tabla IV.12 se muestran los parámetros de regresión obtenidos a partir de las curvas de calibrado correspondientes a cada uno de los HAPs estudiados, en las condiciones experimentales comentadas. Como se observa, los coeficientes de correlación, expresados como R^2 , oscilan entre 0.992 y 0.999, pudiendo establecerse el rango de linealidad de las respuestas entre 2.0 y 50 ng/mL. Los valores correspondientes a las pendientes de las rectas, directamente relacionados con la sensibilidad del método, muestran una tendencia clara, pudiéndose diferenciar grupos de HAPs para los que la sensibilidad disminuye al aumentar el número de

anillos condensados en los hidrocarburos.

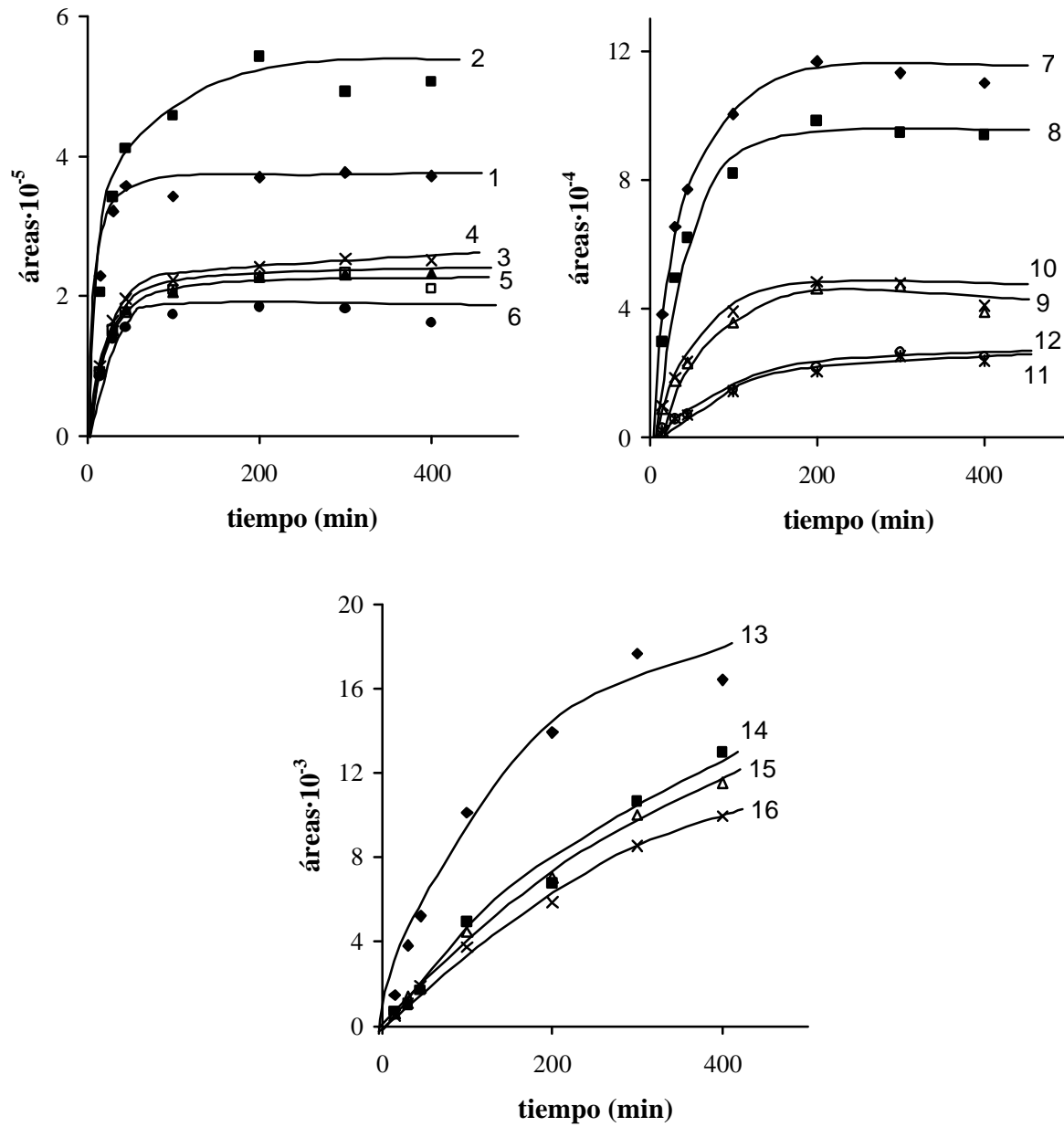


Figura IV.16: Tiempos de equilibrio de los HAPs disueltos en un medio micelar de POLE al 0.88% (p/v) utilizando la fibra de PA en las condiciones optimizadas.

Tabla IV.12.- Parámetros estadísticos de la calibración del método de determinación de HAPs usando una fibra PA de 85 μm , en presencia de un medio micelar de POLE.

HAP	Pendiente \pm SD	Ord.Origen. \pm SD	R ²	S _{y/x}
Naftaleno	7606 \pm 216	-16442 \pm 5039	0.994	10929
Acenaftileno	10240 \pm 246	-19328 \pm 6594	0.996	1141
Acenafteno	4299 \pm 78.6	-7616 \pm 1988	0.998	3848
Fluoreno	4432 \pm 91.6	6489 \pm 2199	0.996	4775
Fenantreno	4301 \pm 75.8	-4599 \pm 1820	0.998	3952
Antraceno	3682 \pm 73.2	-4368 \pm 1756	0.997	3813
Fluoranteno	2151 \pm 39.9	-2548 \pm 958	0.997	2081
Pireno	1722 \pm 27.2	-1761 \pm 651	0.998	1414
Benzo(a)antraceno	812 \pm 14.7	-1766 \pm 395	0.998	661
Criseno	815 \pm 16.0	-1597 \pm 422	0.998	706
Benzo(b)fluoranteno	332 \pm 13.3	-1280 \pm 379	0.994	530
Benzo(k)fluoranteno	327 \pm 6.38	-1183 \pm 183	0.998	257
Benzo(a)pireno	253 \pm 8.32	-1075 \pm 238	0.995	335
Indeno(1,2,3-cd)pireno	83.9 \pm 3.27	-503 \pm 101	0.994	113
Dibenzo(a,h)antraceno	80.8 \pm 0.99	16.2 \pm 30.4	0.999	356
Benzo(ghi)perileno	97.9 \pm 6.2	-627 \pm 210	0.992	196

R: coeficiente de correlación (n=10). S_{y/x}: Error estándar de la estimación.

Los parámetros de calidad del método se recogen en la Tabla IV.13, la precisión del método se determinó llevando a cabo seis extracciones consecutivas de disoluciones micelares

con una concentración de 20 ng/mL para cada uno de los HAPs. Como se observa, las desviaciones estándar relativas oscilan entre 1.73% y 9.93%. En general, los mayores valores de RSD se obtienen para compuestos con 5 anillos o superiores, a los que corresponden porcentajes comprendidos entre 4.06 y 9.93% para el benzo(k)fluoranteno y el dibenzo(a,h)antraceno, respectivamente. Para compuestos con menor masa molecular, la desviación estándar relativa no suele superar el 3%.

Es de destacar la mayor precisión obtenida en presencia de un medio micelar respecto a la obtenida en ausencia de medio micelar, en cuyo caso las RSD oscilaban entre 3.6 y 19.9%. Asimismo, la precisión obtenida en presencia de un medio micelar de POLE es superior a otros valores presentes en la bibliografía para la determinación de HAPs en agua a niveles de ppb [235].

En relación a la reproducibilidad obtenida cuando la microextracción de los HAPs se realiza a partir de un medio acuoso, los mejores resultados obtenidos en presencia del medio micelar pueden estar relacionados con la mayor facilidad y los menores tiempos que se necesitan para que se alcancen los equilibrios de extracción. Si exceptuamos los tres hidrocarburos más pesados, para los que no llegan a alcanzarse los equilibrios en medio micelar, en los 120 minutos seleccionados como tiempo de extracción, el valor medio de las desviaciones estándar relativas de los restantes trece HAPs es de 3.08%, frente al 9.85% que corresponde a las determinaciones realizadas a partir de un medio acuoso.

Por último, los límites de detección establecidos para cada uno de los HAPs, con el método de análisis establecido, con el empleo de microextracción con fibras de poliacrilato y un medio micelar de POLE, oscilan entre 0.55 ng/mL y 10.7 ng/mL, con un valor medio de 3.24 ng/mL. Los límites de detección son ligeramente superiores a los hallados cuando los HAPs se encuentran disueltos en agua, a los que corresponde un valor medio de 2.88 ng/mL. Sin embargo, si se consideran sólo los trece HAPs para los que llega a alcanzarse el equilibrio de extracción en medio micelar, el valor medio de los límites de detección bajaría hasta 2.62 ng/mL.

Tabla IV.13.- Parámetros de calidad del método usando fibras PA en presencia de un medio micelar de POLE.

HAP	Media	S	RSD(%)	t_{exp}	t'_{exp}	LOD(ng/mL)
Naftaleno	19.6	0.377	1.92	1.01	2.47	2.35
Acenaftileno	19.8	0.561	2.83	0.39	0.96	2.42
Acenafteno	20.4	0.353	1.73	0.99	2.43	2.24
Fluoreno	19.6	0.533	2.72	0.80	1.95	0.28
Fenantreno	20.2	0.351	1.74	0.59	1.44	1.59
Antraceno	20.0	0.407	2.03	0.05	0.11	1.82
Fluoranteno	19.5	0.481	2.46	0.96	2.35	2.09
Pireno	19.5	0.541	2.77	0.88	2.17	1.97
Benzo(a)antraceno	19.3	0.493	2.55	1.34	3.27	3.50
Criseno	20.2	0.542	2.69	0.31	0.76	2.41
Benzo(b)fluoranteno	19.6	1.230	6.28	0.33	0.82	4.30
Benzo(k)fluoranteno	20.8	1.306	6.27	0.64	1.57	3.72
Benzo(a)pireno	19.2	0.779	4.06	1.03	2.52	5.44
Indeno(1,2,3-cd)pireno	20.1	1.158	5.75	0.11	0.27	6.83
Dibenzo(a,h)antraceno	18.1	1.800	9.93	1.04	2.55	3.28
Benzo(ghi)perileno	21.1	1.202	5.70	0.90	2.21	7.66

 $t_{0.05,6} = 2.57$

IV.3.4.2.- Determinación de HAPs contenidos en sedimentos marinos mediante microextracción en fase sólida micelar y CG-MS

Son escasos los trabajos publicados hasta este momento basados en la utilización de la microextracción en fase sólida para la determinación de analitos contenidos en muestras sólidas. Entre otras dificultades a vencer, se encuentran las inherentes a la calibración de la fibra, así como a la contaminación del recubrimiento de la fibra por componentes de la muestra, es decir, lo que podría denominarse efecto matriz.

Con el fin de subsanar dichas dificultades, algunos autores hacen uso de métodos basados en la técnica de espacio en cabeza-microextracción en fase sólida o adición de disolventes orgánicos, para aumentar la solubilidad de compuestos hidrófobos, como los HAPs, en medios acuosos.

Con tal finalidad, pueden utilizarse medios micelares, aunque el uso de procedimientos basados en surfactantes para la preparación de muestras que contienen compuestos orgánicos, antes de su análisis por CG, no está bien desarrollado y son pocas las referencias a esta metodología en la literatura. Froschl y col. [263] han desarrollado un método para la determinación de PCBs en agua, basado en la combinación de extracción micelar y CG con un detector de captura electrónica. Los PCBs son preconcentrados con Triton X-100 y la fase rica en surfactante se trata adecuadamente con objeto de eliminar el surfactante, antes de su introducción en el cromatógrafo. Para ello, la fase rica en surfactante se hace pasar a través de una columna de gel de sílice, y luego se somete a elución con n-hexano. El resto del Triton X-100 es separado con el uso de una segunda columna que contiene Florisil. Después de este paso de *clean-up*, los PCBs se separan y cuantifican por CG-ECD.

En atención a los resultados comentados en apartados anteriores, la microextracción en fase sólida parece presentarse como una forma de compatibilizar la extracción en medio micelar, con la CG con detección de masas, sin tener que recurrir a un paso previo para eliminar el surfactante.

En el Capítulo II de la presente Memoria se ha propuesto la extracción de HAPs contenidos en sedimentos marinos, con un medio micelar de POLE y el empleo de las técnicas

de microondas o ultrasonidos. Dichos métodos de extracción han sido validados utilizando un material de referencia certificado, concretamente el sedimento marino SRM 1941a. La determinación de HAPs se ha llevado a cabo por cromatografía líquida de alta eficacia con detección fluorescente.

Por otra parte, como se ha citado en el apartado anterior, la concentración de surfactante en la fase micelar es un factor limitante al establecer las condiciones experimentales adecuadas para la extracción y determinación de los HAPs, haciendo uso de microextracción en fase sólida. Al respecto, se debe recordar que la situación de partida es la constituida por las disoluciones de HAPs obtenidas con el empleo de microondas o ultrasonidos, con unas concentraciones de POLE de 1.25% (p/v) y 6.26% (p/v), respectivamente.

La concentración de 6.26% (p/v) en POLE, en la disolución procedente de la extracción asistida por ultrasonidos de los HAPs contenidos en muestras de sedimento, obligaría a realizar una dilución importante del extracto para alcanzar una concentración final de POLE del 0.88% (p/v), establecida como adecuada en el apartado anterior. Con dicha dilución se produciría también una disminución en la concentración de los HAPs, que no podría ser compensada con el factor de preconcentración que se consigue con la microextracción en fase sólida, para alcanzar límites de detección aceptables.

En atención a lo expuesto, la disolución de HAPs en medio micelar que se obtiene cuando la extracción de los hidrocarburos contenidos en un sedimento marino es asistida por microondas, con una concentración de 1.25% (p/v) en POLE, resulta más adecuada, atendiendo a que la dilución a emplear es mínima. Además, con la técnica de microondas sólo se requiere de 5 minutos para completar la extracción, en comparación con los 210 minutos que se requiere para la extracción de HAPs en el sedimento de referencia cuando se utilizan ultrasonidos.

Por las razones citadas, en el método de análisis que se propone la extracción de los HAPs se lleva a cabo en un medio micelar de POLE haciendo uso de microondas. Las condiciones experimentales referidas a la concentración de surfactante, tiempo de extracción, potencia y presión en el interior del reactor corresponden a las optimizadas en el Capítulo II de la presente Memoria.

Sin embargo, con objeto de mejorar el límite de detección del método, se han realizado

estudios en los que se varía la cantidad de sedimento entre 200 y 500 mg, utilizando en todos los casos 10 mL de surfactante. Los resultados obtenidos, recogidos en la Tabla IV.14, ponen de manifiesto que el empleo de cantidades superiores a 200 mg trae consigo una disminución en las recuperaciones de los hidrocarburos, resultados que son concordantes con los obtenidos con anterioridad.

La Tabla IV.15 muestra las recuperaciones medias encontradas cuando seis porciones de 200 mg del sedimento de referencia se extraen con 10 mL de POLE al 1.25% (p/v), aplicando la radiación de microondas durante 5 min, al 60% de potencia del horno, y una presión en el interior de los reactores de 2.03 psi. Los extractos obtenidos son diluidos hasta alcanzar una concentración al 0.88% (p/v) en POLE, y posteriormente determinados por cromatografía de gases-espectrometría de masas con microextracción en fase sólida con fibra de poliacrilato. En la Figura IV.17 se muestra un cromatograma representativo.

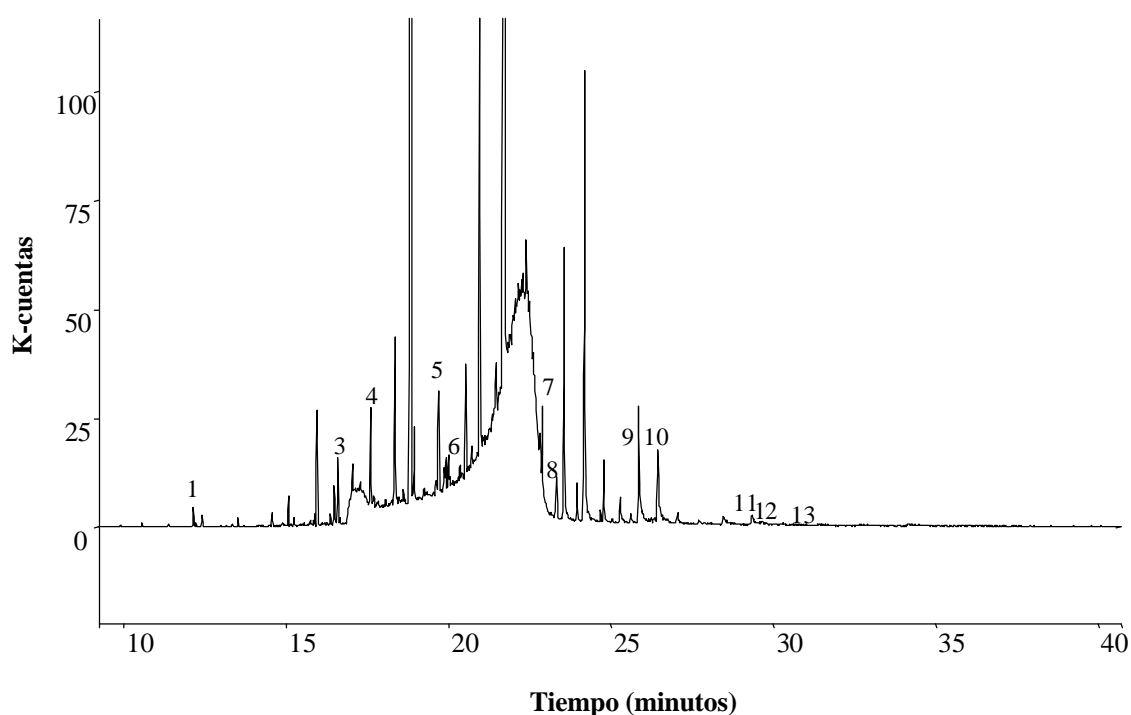


Figura IV.17: Cromatograma (barrido de 128 a 278 u.m.a.) del extracto de HAPs en medio micelar tras someter al sedimento de referencia a extracción micelar asistida por microondas y posterior determinación por SPME-CG-MS con fibra de PA, en las condiciones descritas.

De los dieciséis HAPs estudiados, hemos cuantificados diez, con recuperaciones aceptables, comprendidas entre el 58.6 y el 112% para el fenantreno y el benzo(k)fluoranteno, respectivamente. Las recuperaciones encontradas para HAPs volátiles así como para los HAPs más pesados resultan muy bajas. En el primer caso, estos hidrocarburos pueden perderse durante el proceso de extracción, tal y como se ha comentado. Las bajas recuperaciones de los hidrocarburos más pesados: dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno e indeno(1,2,3-cd)pireno, se deben a su escasa retención en la microfibra.

La precisión obtenida, estimada como la desviación estándar relativa, para cada uno de los HAPs considerados resulta ser próxima a los valores certificados incluso, para alguno de los HAPs, inferiores.

Tabla IV.14.- Influencia de la cantidad de sedimento en el porcentaje de recuperación de HAPs contenidos en sedimentos, mediante extracción micelar y posterior microextracción en fase sólida y CG-MS.

HAP	Recuperación (%)		
	0.2g	0.3g	0.5g
Fluoreno	57.7	16.9	18.0
Fenantreno	46.5	40.6	28.2
Antraceno	77.8	64.0	39.7
Fluoranteno	58.6	47.9	39.9
Pireno	46.9	38.9	29.4
Benzo(a)antraceno	74.4	62.9	33.2
Criseno	104	77.5	55.4
Benzo(b)fluoranteno	93.5	71.9	46.9
Benzo(k)fluoranteno	147	65.1	50.9
Benzo(a)pireno	86.6	40	45.2

Tabla IV.15.- Recuperaciones medias y porcentajes de RSDs para el sedimento marino SRM 1941a, obtenidos por extracción micelar asistida por microondas, y posterior microextracción en fase sólida micelar con determinación por cromatografía de gases con espectrometría de masas.

HAP	Valores certificados (ng/g)	S^a (ng/g)	RSD^b (%)	Valores experimentales (ng/g)	S^c (ng/g)	RSD^d (%)	Recuperación (%)
Fluoreno	97.3	8.6	8.8	97.1	14.9	15.4	99.8
Fenantreno	489	23	4.7	286.3	7.87	2.7	58.6
Antraceno	184	14	7.6	170.6	18.8	11	92.7
Fluoranteno	981	78	7.9	676.5	11.9	18	68.9
Pireno	811	24	2.9	492.0	14.5	3.0	60.7
Benzo(a)antraceno	427	25	5.8	330.2	31.5	9.5	77.3
Criseno	380	24	6.3	404.4	12.2	3.0	106.4
Benzo(b)fluoranteno	740	110	14.9	782.9	86.6	11.1	105.8
Benzo(k)fluoranteno	361	18	4.9	402.5	68.6	17.0	111.5
Benzo(a)pireno	628	52	8.3	520.2	26.4	5.1	82.8

^a Desviación estándar de los valores certificados. ^b Desviación estándar relativa de los valores certificados

^c Desviación estándar de los valores experimentales. ^d Desviación estándar relativa de los valores experimentales

CONCLUSIONES

1) Se propone la extracción ultrasónica de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos presentes en sedimentos marinos, con la utilización de un medio micelar de Polioxietilen-10-lauriléter (POLE), como paso previo a su determinación por HPLC con detección UV. El uso de un diseño factorial de dos niveles ha permitido optimizar las siguientes variables experimentales: concentración de surfactante, relación volumen de surfactante/cantidad de sedimento y tiempo de extracción, poniéndose de manifiesto que la concentración de surfactante es el factor más significativo. Las extracciones realizadas con las condiciones experimentales establecidas presentan recuperaciones, para los hidrocarburos con un número de anillos superior a tres, que oscilan entre 86.70 y 106.6%.

2) Se desarrolla un método para la extracción de HAPs contenidos en sedimentos marinos, basado en combinar el poder solubilizante de un medio micelar de POLE y la acción de la radiación de microondas, en un recipiente cerrado. Mediante el empleo de un diseño factorial, se han establecido los valores más adecuados de las variables que afectan a la extracción asistida por microondas: cantidad de sedimento, volumen y concentración de surfactante, potencia de microondas, presión máxima en el interior de los reactores y tiempo de extracción. Para hidrocarburos aromáticos policíclicos con más de tres anillos en su molécula, la reproducibilidad del método establecido es elevada y las recuperaciones alcanzadas se encuentran entre el 85.70 y el 100.7%.

3) Se ha establecido un método para la determinación de HAPs contenidos en un medio micelar de POLE, mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorescente. Los límites de detección obtenidos se encuentran en el intervalo 0.03 a 1.09 ng/mL, para el benzo(k)fluoranteno y el pireno, respectivamente, y resultan adecuados para la determinación de HAPs presentes en sedimentos poco contaminados.

4) Para validar los métodos de extracción de HAPs contenidos en sedimentos, mediante extracción micelar con POLE asistida por microondas o ultrasonidos, se ha utilizado un

sedimento marino certificado: SRM 1941a. Para los hidrocarburos con más de tres anillos, se obtienen recuperaciones medias de 77.4% y 86.5% para las extracciones realizadas con el empleo de microondas o ultrasonidos, respectivamente. La precisión obtenida para ambos métodos, expresada en términos de desviación estándar relativa, presenta valores similares o inferiores a los certificados.

5) Los resultados obtenidos en las determinaciones de HAPs contenidos en distintas muestras de sedimentos, ponen de manifiesto que la extracción con un medio micelar de POLE, asistida por ultrasonidos o microondas, es una buena alternativa a los métodos convencionales. Las principales ventajas son: reducción de la cantidad de muestra necesaria, sustitución de disolventes orgánicos indeseables por su toxicidad y características contaminantes, facilidad para la inyección directa de los extractos en el sistema cromatográfico sin necesidad de introducir una etapa de *clean-up*, posibilidad de realizar, de forma simultánea, un número elevado de extracciones y, especialmente, una considerable reducción en el tiempo de análisis.

6) Se establecen las principales características asociadas a la obtención del Punto Nube con polioxietilen-10-lauriléter, incluyendo la optimización del proceso de separación de fases. Entre los resultados obtenidos podemos destacar que la temperatura crítica, por encima de la cual se debe trabajar para obtener la separación de las fases, es de 82 °C. Además, para una concentración de surfactante de 3.1% (p/v) y un volumen de disolución de 3 mL, se alcanza un factor de preconcentración de 7.2.

7) La adición de electrolitos a la disolución de POLE, además de facilitar la separación de fases, provoca descensos considerables en la temperatura de Punto Nube. Por otra parte, la presencia de modificadores orgánicos provoca aumentos de la temperatura de Punto Nube, que varían de forma prácticamente lineal con el porcentaje de modificador orgánico. Asimismo, en presencia de etanol, las recuperaciones alcanzadas con la metodología de Punto Nube no se modifican de forma considerable, si bien el factor de preconcentración aumenta al hacerlo el

modificador orgánico.

8) Se aplica la metodología de Punto Nube para conseguir la preconcentración de los HAPs contenidos en muestras de sedimentos marinos, después de ser extraídos con un medio micelar de POLE y el empleo de técnicas de microondas y ultrasonidos. Para los hidrocarburos con más de tres anillos condensados, las recuperaciones medias obtenidas, tras los procesos de extracción y preconcentración, fueron de 98.8% para las muestras tratadas con microondas, y de 106.8% cuando la extracción fue asistida por ultrasonidos.

La combinación de las metodologías utilizadas permite conseguir aumentos considerables de sensibilidad. Con la excepción del benzo(a)pireno, los límites de detección establecidos son entre 7 y 15 veces inferiores a los que se obtienen cuando las muestras no se someten a preconcentración por Punto Nube.

9) La metodología de Punto Nube, con la utilización de POLE, puede extenderse a otros medios, como el agua de mar, obteniéndose fases ricas en el surfactante que son menos densas que el resto de la disolución, con lo que se facilita la manipulación de los extractos. En estos medios se producen descensos considerables en la temperatura a la que se produce el Punto Nube, al tiempo que, para disoluciones con 1-2 % (p/v) de POLE, se alcanzan factores de preconcentración que oscilan entre 20 y 10.

10) Se desarrolla un método para el análisis de HAPs presentes en el agua de mar, basado en la extracción/preconcentración mediante la metodología de Punto Nube, con POLE como surfactante, antes de su determinación por HPLC con detección fluorescente. Los límites de detección obtenidos para los distintos HAPs, varían entre 1.0 y 150 ng/L, mientras que las desviaciones estándar son, en general, inferiores al 10%. La adición de POLE a las muestras en el momento de ser tomadas ejerce un efecto inhibitorio importante sobre la retención de los HAPs por adsorción en las paredes del recipiente o sobre la materia particulada presente en el agua de mar, durante el almacenamiento.

11) Se estudian los equilibrios de distribución de diferentes HAPs, entre una fase acuosa y fases estacionarias de polidimetilsiloxano y poliacrilato, que constituyen el recubrimiento de las fibras utilizadas para la microextracción en fase sólida de tales compuestos. En términos generales, puede concluirse diciendo que:

- S Los equilibrios de distribución dependen del compuesto considerado.
- S Los tiempos de equilibrio, para los distintos HAPs, aumentan con la masa molecular del hidrocarburo considerado.
- S En general, para los HAPs en estudio, los tiempo de equilibrio se alcanzan más rápidamente para las fibras de polidimetilsiloxano que para las de poliacrilato.

12) En presencia de surfactantes catiónicos, aniónicos y no iónicos, la eficacia en la retención de HAPs mediante microextracción en fase sólida, disminuye exponencialmente con la concentración de surfactante. Además, en estos procesos:

- S Al aumentar el peso molecular de los HAPs y, en todo caso, el número de anillos aromáticos condensados, disminuye la eficacia de la extracción.
- S La combinación formada por el recubrimiento de poliacrilato y por el surfactante no iónico empleado (POLE), es la que proporciona mayores eficacias en la extracción de los HAPs.
- S La eficacia de la microextracción en fase sólida aplicada a HAPs disueltos en un medio micelar de POLE, aumenta al disminuir la fuerza de las interacciones que tienen lugar entre los hidrocarburos y la fase micelar.

13) Se desarrolla un nuevo método para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, después de ser extraídos desde un medio micelar de POLE por fibras de poliacrilato, para provocar su desorción posterior en un cromatógrafo de gases con detección por espectrometría de masas. El método destaca por presentar una reproducibilidad

considerablemente superior a la obtenida cuando se parte de un medio acuoso. Los límites de detección obtenidos oscilan entre 0.28 y 7.66 ng/mL.

14) Para la determinación de HAPs contenidos en sedimentos marinos, se propone un método basado en la extracción con POLE asistida por microondas, seguida de microextracción en fase sólida con una fibra de poliacrilato y la desorción-determinación por CG-MS.

El método se ha aplicado a la determinación de HAPs contenidos en el sedimento marino certificado (SRM 1941a), obteniéndose recuperaciones aceptables para diez de los dieciséis hidrocarburos estudiados, con precisiones próximas, o inferiores, a los valores certificados.

15) Se explora, con resultados alentadores, la posible utilización de la microextracción en fase sólida, como soporte experimental, para el cálculo de constantes de asociación HAPs-micela, basada en la disminución que se observa en la eficacia de dicha técnica para conseguir la extracción de los hidrocarburos, al aumentar la concentración de POLE en disoluciones micelares.

Las constantes halladas se correlacionan con parámetros representativos de la hidrofobicidad de los HAPs, y de parámetros topológicos y geométricos característicos de sus moléculas. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la microextracción en fase sólida podría constituir una técnica adecuada para la determinación de constantes de asociación soluto-micela.

BIBLIOGRAFÍA

-
- [1] M. Zander. "The Handbook of Environmental Chemistry", Vol.3, Parte A. O. Hutzinger (ed). Springer-Verlag Berlín, pp.109-131 (1980).
- [2] B. Bjørseth. "Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons". B. Bjørseth (ed), Marcel Dekker Inc. New York, (1983).
- [3] C.E.Cerniglia y M.A.Heitkamp."Metabolism of PAHs in the Aquatic Environment". U. Varanasi (ed). CRC Press, Boca Raton, (1989).
- [4] D.T. Gibson. *Science*, 161 (1969) 1093.
- [5] D.J. Freeman y F.C. Catell. *Environ. Sci. Technol.*, 24 (1990) 1581.
- [6] S.R. McDow, S. Quing-Rui, Matti Vartiainen, Yu-Sun Hong, Yi-Lin Yao, Fister T, Rong-qi Yao y R.M. Karmens. *Environ. Sci. Technol.*, 28 (1994) 2147.
- [7] Y.P. Chin y P.M. Gschwend. *Environ. Sci. Technol.*, 26 (1992) 1621.
- [8] J.T. McCloskey y J.T. Orig., *Aquatic Toxicol.*, 24 (1993) 207.
- [9] A.M. Hansen, O.M. Poulsen, T. Sigsgaard y J.M. Christensen. *Anal. Chim. Acta*, 291 (1994) 341.
- [10] J. Law y J.L. Biscaya. *Mar. Poll. Bull.*, 29 (1994) 238.
- [11] J.M. Smith. "PAH from coal utilization. Emissions and effects". Report nº ICTIS/TR29. IEA. Coal Research. London. (1984).
- [12] J.O. Grimalt y J. Olivé. *Anal. Chim. Acta.*, 278 (1993) 159.
- [13] S. Kira, T. Itoh, H. Hayatsu, K. Taketa, Y. Zheng, R. Li, T.L. Holliday y C.S. Giam. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 53 (1994) 285.
- [14] J.L. Durant, W.G. Thilly, H.F. Hemond y A.L. Lafleur. *Environ. Sci. Technol.*, 28 (1994) 2033.
- [15] D. Broman, A. Colmsjö, D. Ganning, C. Näf, Y.Zebühr y C. Östman. *Mar. Poll. Bull.*, 18 (1987) 380.
- [16] J. W. Readman, R.F.C. Mantoura, M.M. Rhead y L. Brown. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 14 (1982) 369.
- [17] U. Varanasi. "Metabolism of PAH in the Aquatic Environment". U. Varanasi (ed). CRC Press, Boca Raton, (1989).
- [18] A.E. McElroy, J.W. Farrington y J.M. Teal. "Metabolism of PAH in the Aquatic Environment". U. Varanasi (ed). CRC Press, Boca Raton, (1989).
- [19] D. J. H. Phillips y P.S. Rainbow. "Biomonitoring of trace aquatic contaminants". Chapman & Hall, Londres, (1994).

- [20] D.J.H. Phillips. *Environ. Pollut.*, 13 (1977) 281.
- [21] D.J.H. Phillips. "Quantitative aquatic biological indicators: their use to monitor trace metal and organochlorine pollution", Applied Science Publishers, London. (1980).
- [22] J.M. Neff. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 319 (1984) 132.
- [23] J.P. Knezovich, F.L. Harrison y R.G. Wilhelm. *Water, Air Soil Pollut.*, 32 (1987) 233.
- [24] H.S. Frank y M.W. Evans, *J. Phys. Chem*, 13 (1945) 507.
- [25] C. Tanford, "The Hydrophobic Effect", 2nd Ed. Wiley-Interscience, New York, (1980).
- [26] P. Mukerjee y J.R. Cardinal, *J. Phys. Chem.*, 82 (1978) 1620.
- [27] C. Tanford, *J. Phys. Chem.*, 78 (1974) 2469.
- [28] F. Israelchivili y V. Luzatti, *J. Phys. Chem.*, 71 (1967) 3320.
- [29] F.M. Menger, *Acc. Chem. Res.*, 12 (1979) 111.
- [30] F.M. Menger y B.J. Boyer, *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (1980) 5936.
- [31] F.M. Menger y J.M. Bonicamp, *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 2140.
- [32] P. Fromherz, *Chem. Phys. Lett.*, 77 (1981) 460.
- [33] K.A. Dill, D.E. Koppel, R.S. Cantor, J.D. Dill, D. Bendedouch y S.H. Chen, *Nature*, 309 (1984) 42.
- [34] W.L. Courchene, *J. Phys. Chem.*, 68 (1964) 1870.
- [35] D. Bendedouch, S.H. Chen y W.C. Koeler, *J. Phys. Chem.*, 87 (1983) 2621.
- [36] K.S. Birdi, *Prog. Colloid Polym. Sci.*, 70 (1985) 23.
- [37] J.H. Fendler, E.J. Fendler, "Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems". Academic Press, New York, (1975).
- [38] N. Muller y R.H. Birkhahn, *J. Phys. Chem.*, 71 (1967) 957.
- [39] D. Myers, "Surfactant Science and Technology", VCH Publishers, Einheim, Germany, (1988).
- [40] D.J. Shaw, "Introduction to Colloid and Surface Chemistry"; 3rd ed., Butterworths, London, (1980).
- [41] W.L. Hinze, "Ordered Media in Chemical Separations". D.W. Armstrong, Eds.; ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D.C., (1987).
- [42] L.J. Cline-Love, J.G. Habarta y J.G. Dorsey, *Anal. Chem.* 56 (1984) 1132A.
- [43] K. Shinoda, T. Nakagawa, B. Tamamushi y T. Isemura, "Colloidal Surfactants", Acad.

- Press., New York, (1963).
- [44] D.W. Armstrong, *Sep. Purif. Methods*, 14 (1985) 213.
- [45] B. Lindman, H. Wennerstrom y H. Eicke, "Micelles" en "Topics in Current Chemistry", Springer-Verlag, New York, (1980).
- [46] G.L. Mcintire, *Am. Lab.* 18 (1986) 173.
- [47] E. Pelizzetti y E. Pramauro, *Anal. Chim. Acta*, 1 (1985) 169.
- [48] G.L. Mcintire y H.N. Blount, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 7720.
- [49] C.A. Evans y J.R. Bolton, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1979) 4502.
- [50] G.L. Mcintire, D.M. Chiappardi, R.L. Casselberry y H.N. Blount, *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 2532.
- [51] M. Donbrow y C.T. Rhodes, *J. Pharm. Pharmacol.* 18 (1966) 424.
- [52] T.H. Walter, E.E. Bancroft, G.L. Mcintire, E.R. Davis, L.M. Gierasch, H.N. Blount, H.J. Stronks y E.G. Janzen, *Can. J. Chem.*, 60 (1982) 1621.
- [53] P.A. Brugger, P.P. Infelta, A.M. Brown y M.J. Gratzel, *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 320.
- [54] Z. Mao y Q. Zhang. *Fenxi-Huaxue*. 12 (1984) 12.
- [55] A. Berthod y C. García-Álvarez-Coque. "Micellar Liquid Chromatography". Marcel Dekker, Inc. New York. Basel. (2000) p. 45.
- [56] C. Laane, S. Giovenco, M. Dekker, J. Baltussen, K. Van't Riet, B. Bijsterbosch y C. Veeger. Abstract of Papers, Sixht International Symposium on Surfactants in Soln. New Delhi, India, Agosto (1986) Abstract N° AA35L, 265.
- [57] M.E. Leser, G. Wei y P.L. Luisi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135 (1986) 629.
- [58] K.E. Goklen y T.A. Hatton. *Biotechnol. Prog.* 1 (1985) 69.
- [59] K.L. Kadam. *Enzyme and Microbial Techn.* 8 (1986) 266.
- [60] D.W. Armstrong y G.Y. Stine. *J. Am. Chem. Soc.* 3 (1983) 6220.
- [61] M.F. Borgerding y W.L. Hinze. *Anal. Chem.* 57 (1985) 2138.
- [62] A. Böckelen y R. Niessner. *Fresenius J. Anal. Chem.* 346 (1993) 435.
- [63] M.E. Fernández-Laespada, J.L. Pérez-Pavón y B. Moreno-Cordero. *Analyst* 118 (1993) 209.
- [64] R. Ferrer, J.L. Beltrán y J. Guiteras. *Anal. Chim. Acta.* 330 (1996) 199.
- [65] J.G. Dorsey. *Adv. Chromatogr.* 27 (1987) 168.

- [66] D.W. Armstrong y F. Nome. *Anal. Chem.* 53 (1981) 1662.
- [67] A. Berthod, I. Girard y C. Gonnet. *Anal. Chem.* 58 (1986) 1362.
- [68] D.W. Armstrong y G.Y. Stine. *Anal. Chem.* 55 (1983) 2317.
- [69] M. Arunyanart y L.J. Cline-Love. *Anal. Chem.* 57 (1985) 2837.
- [70] A. Berthod, I. Girard y C. Gonnet. *Anal. Chem.* 58 (1986) 1356.
- [71] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichiwa, A. Tsuchiya y T. Ando. *Anal. Chem.* 56 (1984) 111.
- [72] P.G. Righetti. "Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology" P.G. Righetti (Ed) CRC Press, Boca Ratón, FL (1996).
- [73] M.J. Sepaniak, A.C. Powell, D.F. Swaile y R.O. Cole. "Fundamentals of MEKC, in Capillary Electrophoresis". P.D. Grossman y J.C. Colburn (Ed), Capítulo 6, pp. 159-189. Academic Press Inc., New York, (1992).
- [74] K. Otsuka and S. Terabe. "MEKC, en Capillary Electrophoresis Guidebook". K. Altria (Ed), "Methods in Molecular Biology" 52, Capítulo 12, pp. 125-155. Humana Press Inc. Totowa, NJ (1996).
- [75] N.A. Guzmán. "Capillary Electrophoresis Technology, Chromatographic Science Series, 64". N.A. Guzmán (Ed), Marcel Dekker Inc, New York, (1994).
- [76] D.R. Baker. "Capillary Electrophoresis". J. Wiley & Sons, Inc., New York (1995).
- [77] E. Pramauro y A. Bianco-Prevot. *Pure and Applied Chem.* 67 (1995) 551.
- [78] E. Pramauro y A. Bianco-Prevot. *Sci. and Technol.* 80 (1998) 733.
- [79] W.L. Hinze. "Organized Surfactant Assemblies in Separation Science", American Chemical Society, Capítulo 1, (1987).
- [80] A. Abu-Samra, J.S.Morris y S.R. Koirtyohann. *Anal. Chem.* 47 (1975) 1475.
- [81] K. Ganzler, A. Salgo y K. Valko. *J. Chromatogr.* 371 (1986) 299.
- [82] K. Ganzler, A. Salgo y Z. Lebensm. *Unters. Forsch.* 184 (1987) 274.
- [83] K.K. Chee, M.K. Wong y H.K. Lee. *J. Chromatogr. A.* 723 (1996) 259.
- [84] J.R.J. Pare y J.M.R. Belanger, S.S. Stafford. *Trends. Anal. Chem.* 13 (1995) 4250.
- [85] M. Letellier y H. Budzinski. *Analisis.* 27 (1999) 259.
- [86] C. Demesmay y M.Olle. *Spectra. Analyse.* 175 (1993) 27.
- [87] B.W. Renoe. *Am. Lab.* 26 (1994) 34.
- [88] V. López-Ávila y J. Benedicto. *Trends. Anal. Chem.* 15 (1996) 334.
- [89] N. Saim, J.R Dean, M.P. Abdullah y Z. Zakaria. *J. Chromatogram. A.* 791 (1997) 361.

- [90] I.J. Barnabas, J.R. Dean y I.A. Fowles, S.P. Owen. *Analyst*. 120 (1995) 1897.
- [91] M. Tomaniova, J. Hajslova, J. Pavelka, V. Kocourek, K. Holadova, I. Klimova. *J. Chromatogr. A*. 827 (1998) 21.
- [92] H. Budzinski, A. Papineau, P. Baumard y P. Garrigues. *C.R. Acad. Sci. Paris*. 321 (1995) 69.
- [93] G. Dupont, C. Delteil, V. Camel y A. Bermond. *Analyst*. 124 (1999) 453.
- [94] S.P. Frost, J.R. Dean, K.P. Evans, K. Harradine, C. Cary y M.H.I. Camber. *Analyst*. 122 (1997) 895.
- [95] M. Letellier y H. Budzinski. *Analyst*. 124 (1999) 5.
- [96] M. Letellier, H. Budzinski y P. Garrigues. *LC-GC Int*. 12 (1999) 222
- [97] V. López-Ávila, R. Young y W.F. Beckert. *Anal. Chem*. 66 (1994) 1097.
- [98] K.K. Chee, M.K. Wong y H.K. Lee. *Anal. Chim. Acta*. 330 (1996) 217.
- [99] V. López-Ávila, R. Young y N. Teplitsky. *J. AOAC. Int*. 79 (1996) 142.
- [100] M. Letellier, H. Budzinski, P. Garrigues y S. Wise. *Spectroscopy*. 13 (1997) 71.
- [101] S. Dupeyron, P.M. Dudermel y D. Couturier. *Analisis*. 25 (1997) 286.
- [102] A. Pastor. E. Vázquez, R. Ciscar y M. de la Guardia. *Anal. Chim. Acta*. 344 (1997) 241.
- [103] K. Li, M. Landriault, M. Fingas y M. Llompart. *Analisis*. 26 (1998) 365.
- [104] V. López-Ávila, R. Young, J. Benedicto, P. Ho, R. Kim y W.F. Beckert. *Anal. Chem*. 67 (1995) 2096.
- [105] E.S. Beary, P.J. Paulsen, L.B. Jassie y J.D. Fassett. *Anal. Chem*. 69 (1997) 758.
- [106] A. Cerdá, M.T. Oms, R. Forteza y V. Cerdá. *Anal. Chim. Acta*. 351 (1997) 273.
- [107] F.I. Onuska y K.A. Terry. *J. High Resol. Chromatogr*. 18 (1995) 417.
- [108] D. Ghosh y D.E. Nichols. *Synthesis*. (1996) 195.
- [109] K.S. Suslik y D.J. Casadonte. *J. Am. Chem. Soc*. 109 (1987) 3459.
- [110] M.V. Anuradh y B. Ravindranath. *Tetrahedron*. 51 (1995) 5671.
- [111] E. Toraud, M. Crone y O. Thomas. *Field Anal. Chem. and Technol*. 2 (1998) 221.
- [112] J.D. Berset, M. Ejem, R. Holzer y P. Lischer. *Analytica Chimica Acta*. 383 (1999) 263.
- [113] S. Pérez, I. Ferrer, M.C. Hennion y D. Barceló. *Anal. Chem*. 70 (1998) 4996.
- [114] O.P. Heemken, N. Theobald y B.W. Wenclawiak. *Anal. Chem*. 69 (1997) 2171.
- [115] S. Babic, M. Petrovic y M. Kastelan-Macan. *J. of Chromatogr. A*. 823 (1998) 3.
- [116] J.L. Snyder, R.L. Grob, M.E. McNally y T.S. Oostdyk. *Anal. Chem*. 64 (1992) 1940.

- [117] G. Hu y X. Wang. *Anal. Lett.* 31 (1998) 1445.
- [118] J. Azeredo, R. Oliveira y V. Lazarova. *Wat. Sci. Technol.* 37 (1998) 367.
- [119] A. Beard, K. Naikwadi, y F.W. Karasek. *J. of Chromatogr. A.* 589 (1992) 265.
- [120] T.S. Oostdyk, R.L. Grob, J.L. Snyder y M.E. McNally. *Anal. Chem.* 65 (1993) 596.
- [121] M.J. Cal-Prieto, J.M. Andrade, A. Carlosena, S. Muniategui, P. López-Mahía y D. Prada. *Química Analítica.* 18 (1999) 137.
- [122] J.L. Capelo, I. Lavilla y C. Bendicho. *J. Anal. At. Spectrom.* 13 (1998) 1285.
- [123] J.W. McKiernan, J.T. Creed, C.A. Brockhoff, J.A. Caruso y R.M. Lorenzana. *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 607.
- [124] S. Río-Segade y C. Bendicho. *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 263.
- [125] Certificate of Analysis of Standard Reference Material 1941a, Organics in Marine Sediment, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, (1994).
- [126] C. Raoux y P. Garrigues, en: P. Garrigues y M. Lamotte (Eds), "Polycyclic Aromatic Compounds", Gordon and Breach, Amsterdam, (1993), p. 443.
- [127] C. Piérard, H. Budzinski y P. Garrigues. *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 2776.
- [128] D. Myers. "Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications"; VCH: New York, (1991).
- [129] V. DeGiorgio. "Nonionic micelles, in Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and Microemulsions"; V. deGiorgio, M. Corti, (Eds.); North-Holland, Amsterdam, (1985) pp. 303-335.
- [130] G.J.J. Tiddy, *Phys. Rep.* 57 (1980) 1.
- [131] H. Huffmann, H.S. Kielman, D. Pavlovic, G. Platz y W. Ulbricht, *J. Colloid Interface Sci.* 80 (1982) 237.
- [132] N.J. Turro y P.L. Kuo, *Langmuir.* 1 (1985) 170.
- [133] B. Lindman y H. Wennerstrom, *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 6053.
- [134] M. Corti, V. DeGiorgio, J.B. Hayter y M. Zulfanf. *Chem. Phys. Lett.* 109 (1984) 579.
- [135] V. DeGiorgio, R. Piazza, M. Corti y C. Minero. *J. Chem. Phys.* 82 (1984) 1025.
- [136] P. Nilsson, H. Wennerstrom y B. Lindman. *J. Phys. Chem.* 87 (1983) 1377.
- [137] S. Puvvada y D. Blankschtein. *J. Phys. Chem.* 96 (1992) 5579.
- [138] S. Puvvada y D. Blankschtein. *J. Phys. Chem.* 96 (1992) 5567.
- [139] N. Zoeller, L. Lue y D. Blankschtein. *Langmuir.* 13 (1997) 5258.

- [140] S. Puvvada y D. Blankschtein. *J. Chem. Phys.* 92 (1990) 3710.
- [141] D. Blankschtein, A. Shiloach y N. Zoeller. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 48 (1997) 71.
- [142] A. Shiloach y D. Blankschtein. *Langmuir.* 14 (1998) 7166.
- [143] N. Zoeller y A. Shiloach. *Chemtech.* 26 (1996) 24.
- [144] A. Shiloach y D. Blankschtein. *Langmuir.* 14 (1998) 1618.
- [145] W.L. Hinze y E. Pramauro. *CRC. Anal. Chem.* 24 (1993) 133.
- [146] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, C. García-Pinto y E. Fernández Laespada. *J. Chromatogr. A.* 902 (2000) 251.
- [147] M. Brusdeilin y V. Zarybnicky. *J. Chromatogr.* 287 (1984) 313.
- [148] S.M. Zourab, V.M. Sabet y H. Aboeldahal. *J. Dispersion Sci. Tech.*, 12 (1991) 25.
- [149] L. Marszall. *Colloids Surf.*, 25 (1987) 279.
- [150] M.M. Chobarm y M.V. Ropot. *Izv. Akad. Nauk Mold. SSR, Ser. Biol. Khim. Nauk.* 1 (1987) 53 (*Chem. Abstr.*, 107, 61031k).
- [151] F. Tokiwa y T. Matsumoto. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 48 (1975) 1645.
- [152] R. Aveyard y T.A. Lawless. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I.* 82 (1986) 2951.
- [153] P. Firman, D. Haase, J. Jen, M. Kahlweit y R. Strey. *Langmuir.* 1 (1985) 718.
- [154] S.K. Han, S.M. Lee y H. Schott. *J. Colloid Interface Sci.* 132 (1989) 444.
- [155] G. Briganti, S. Puvvada y D. Blankschtein. *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 8990.
- [156] A. Goto, F. Endo y T. Higashino. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 58 (1985) 773.
- [157] A. Goto. M. Nihei y F. Endo. *J. Phys. Chem.* 84 (1980) 2268.
- [158] M. Donbrow y E. Azay. *J. Colloid Interface Sci.* 57 (1976) 20.
- [159] L. Cautu, M. Corti, V. DeGiorgio, H. Huffmann y W. Ulbricht. *J. Colloid Interface Sci.* 116 (1987) 384.
- [160] N. Nishikido. *J. Colloid Interface Sci.* 136 (1990) 401.
- [161] Kaneshina, O. Shibata y M. Nakamua. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 52 (1979) 42.
- [162] D.N. Rubingh y P.M. Holland. "Mixed surfactant systems, in Cationic Surfactants"; D.N. Rubingh y P.M. Holland, (Eds.); Marcel Dekker, Inc.:New York, (1991); pp. 178-187.
- [163] W.B. Limbele, N.M. Van Os, L.A.M. Rupert y R. Zana. *J. Colloid Interface Sci.* 144 (1991) 458.
- [164] T. Suzuki, K. Esumi y K. Meguro. *J. Colloid Interface Sci.* 93 (1983) 205.
- [165] L.D.S. Souza, M. Corti y V. DeGiorgio. *Chem. Phys. Lett.* 131 (1986) 160.

- [166] N. Nishikoto, H.A. Kisada y R. Matuura. *Mem. Fac. Sci., Kyushu Univ., Ser. C.* 10 (1977) 91.
- [167] C. Manokar y V.K. Kelkar. *J. Colloid Interface Sci.* 137 (1990) 604.
- [168] T. Saitoh y W.L. Hinze. *Anal. Chem.* 63 (1991) 2520.
- [169] P.G. Nilsson, B. Lindman y R.G. Laughlin. *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 6357.
- [170] H. Tani, T. Saitoh, T. Kamidate, T. Kamataki y H. Watanabe. *Biotechnol. Bioeng.* 56 (1997) 311.
- [171] T. Saitoh, H. Tani, T. Kamidate, T. Kamataki y H. Watanabe. *Anal. Sci.* 10 (1994) 299.
- [172] Y. Chevalier, F. Melis y J.P. Dalbiez. *J. Phys. Chem.* 96 (1992) 8614.
- [173] K.W. Hermann, J.G. Brushmiller y W.L. Courchene. *J. Phys. Chem.* 70 (1966) 2909.
- [174] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio y D. Pérez-Bendito. *Anal. Chem.* 71 (1999) 4519.
- [175] H. Watanabe, en "Solution Behavior of Surfactants": K.L. Mittal y E.J. Fendler, (Eds.); Plenum Press: New York, (1982); pp.1305-1316.
- [176] B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, C. García-Pinto y E. Fernández-Laespada. *Talanta.* 40 (1993) 1703.
- [177] C. García-Pinto, J.L. Pérez-Pavón y B. Moreno-Cordero. *Anal. Chem.* 64 (1992) 2334.
- [178] C. García-Pinto, J.L. Pérez-Pavón y B. Moreno-Cordero. *Anal. Chem.* 66 (1994) 874.
- [179] S.R. Sirimanne, J.R. Barr, D.G. Patterson y L. Ma. *Anal. Chem.* 68 (1996) 1556.
- [180] A. López-García, E. Blanco-González, J.I. García-Alonso y A. Sanz-Medel. *Anal. Chim. Acta.* 264 (1992) 241.
- [181] D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, N. Mariasso y E.A.G. Zagatto. *Anal. Chim. Acta.* 392 (1999) 29.
- [182] J.J. Santana, Z. Sosa, A. Afonso y V. González. *Talanta.* 39 (1992) 1611.
- [183] APHA, AWWA, WPCF, Métodos normalizados de análisis de aguas potables y residuales, Ed. Díaz de Santos, S.A., Madrid (España), (1992), 8.
- [184] R.P. Frankewich y W.L. Hinze. *Anal. Chem.* 66 (1994) 944.
- [185] T. Gu y P.A. Galera-Gómez. *Colloids and surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 104 (1995) 307.
- [186] W.J. Horvath y C. Huie. *Talanta.* 39 (1992) 487.
- [187] M.F. Silva, L. Fernández, R.A. Olsina y D. Stacchiola. *Anal. Chim. Acta* 342 (1997) 229.
- [188] M.F. Silva, L. Fernández y R.A. Olsina. *Analyst* 123 (1998) 1803.

- [189] F.H. Quina y W.L. Hinze. *Ind. and Engin. Research*, 38 (1999) 4150.
- [190] R.K. Symons y I. Crick. *Anal. Chim. Acta*, 15 (1999) 237.
- [191] N.T. Crosby, D.C. Hunt, L.A. Philp y I. Patel. *Analyst*, 106 (1981) 135.
- [192] W.E. Johnson, N.J. Fendinger y J.R. Plimmer. *Anal. Chem.*, 63 (1991) 510.
- [193] J. Pawliszyn. "Solid Phase Microextraction: Theory and Practice", Wiley-VCH Inc., New York, (1997).
- [194] D. Barceló. *J. Chromatogr.* 643 (1993) 117.
- [195] N. Masqué, R.M. Marcé y F. Borrull. *Trends. Anal. Chem.* 17 (1998) 384.
- [196] C. Aguilar, F. Borrull y R.M. Marcé. *J. Chromatogr. A.* 771 (1997) 221.
- [197] B. Zygmunt. *J. High Resolut. Chromatogr.* 20 (1997) 482.
- [198] M.R. Lee, J.S. Lee, W.S. Hsiang y C.M. Chen. *J. Chromatogr. A.* 775 (1997) 267.
- [199] F. Magnani y R. Cenciarini. *Chromatographia.* 41 (1995) 678.
- [200] Y. Liu, M.L. Lee, K.J. Hageman, Y. Yang y S.B. Hawthorne. *Anal. Chem.* 69 (1997) 5001.
- [201] M.T. Almeida, P.M.A.R. Conceicao y M.F. Alpendurada. *Analisis.* 25 (1995) 51.
- [202] M.R. Negro y M.F. Alpendurada. *J. Chromatogr. A.* 823 (1998) 221.
- [203] A.L. Nguyen y J.H.T. Luong. *Anal. Chem.* 69 (1997) 1726.
- [204] J.J. Langenfeld, S.B. Hawthorne y D.J. Miller. *Anal. Chem.* 68 (1996) 144.
- [205] R.J. Bartelt y B.W. Zikowski. *Anal. Chem.* 71 (1999) 92.
- [206] P.A. Frazey, R.M. Barkley y R.E. Sievers. *Anal. Chem.* 70 (1998) 638.
- [207] F. Yang y Y.K. Chau. *Analyst.* 124 (1999) 171.
- [208] D.W. Potter y J. Pawliszyn. *J. Chromatogr.* 625 (1992) 247.
- [209] S. Madgic y J.B. Pawliszyn. *J. Chromatogr. A.* 723 (1996) 111.
- [210] C. Miége y J. Dugay. *Analisis.* 6 (1998) 26.
- [211] R. Eisert y K. Levsen. *Fresenius J. Anal. Chem.* 351 (1995) 555.
- [212] K. Jinno, T. Muramatsu, Y. Saito, Y. Kiso, S. Madgic y J. Pawliszyn. *J. Chromatogr. A.* 754 (1996) 137.
- [213] M.R. Pinto y M.F. Alpendurada. *Submitted for publication.*
- [214] P. Barták y L. Cáp. *J. Chromatogr. A.* 767 (1997) 171.
- [215] M.R. Lee, Y.C. Yeh, W.S. Hsiang y B.H. Hwang. *J. Chromatogr. A.* 806 (1998) 317.
- [216] C.G. Zambonin y F. Palmisano. *Analyst.* 123 (1998) 2825.

- [217] A.A. Boyd-Boland y J.B. Pawliszyn. *J. Chromatogr. A.* 704 (1995) 163.
- [218] R. Shirey, V. Mani y M. Butler. *The Reporter, Supelco Bull.* 14 (1995) 4.
- [219] R. Eisert y K. Levsen. *J. Chromatogr. A.* 737 (1996) 59.
- [220] Z. Zhang y J. Pawliszyn. *Anal. Chem.* 67 (1995) 34.
- [221] R. Eisert y K. Levsen. *Am. Soc. Mass Spectrom.* 6 (1995) 1119.
- [222] B.D. Page y G. Lacroix. *J. Chromatogr. A.* 757 (1997) 173.
- [223] I. Valor, J.C. Moltó, D. Apraiz y G. Font. *J. Chromatogr. A.* 767 (1997) 195.
- [224] J. Poerschmann, F.D. Kopinke y J. Pawliszyn. *J. Chromatogr. A.* 816 (1998) 159.
- [225] J. Poerschmann. *J. Microcolumn Separations.* 12 (2000) 603.
- [226] J. Poerschmann, T. Górecki y F.D. Kopinke. *Environm. Sci. Technol.* 34 (2000) 3824.
- [227] L. Pan y J. Pawliszyn. *Anal. Chem.* 69 (1997) 196.
- [228] L. Pan, M.A. Adams y J. Pawliszyn. *Anal. Chem.* 67 (1995) 4396.
- [229] J. Namiesnik, D. Gorlo, L. Wolska y B. Zygmunt. *Analisis.* 26 (1998) 170.
- [230] P.A. Martos, A. Saraullo y J. Pawliszyn. *Anal. Chem.* 69 (1997) 402.
- [231] H.L. Lord y J. Pawliszyn. *LC-GC Int.* (1998) May, S41.
- [232] P.A. Martos y J. Pawliszyn. *Anal. Chem.* 70 (1998) 2311.
- [233] M. Chai y J. Pawliszyn. *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 693.
- [234] M.R. Lee, R.J. Lee, Y.W. Lin, C.M. Chen y B.H. Huang. *Anal. Chem.* 70 (1998) 1963.
- [235] R. Doong, S. Chang y Y. Sun. *J. of Chromatogr. Sci.* 38 (2000) 528.
- [236] R. Doong, S. Chang y Y. Sun. *J. Chromatogr. A.* 879 (2000) 177.
- [237] F.J. Santos, M.N. Sarrión y M.T. Galcerán. *J. of Chromatogr. A.* 771 (1997) 181.
- [238] D. Cam, S. Gagni, L. Meldolesi y G. Galletti. *J. of Chromatogr. Sci.* 38 (2000) 55.
- [239] A. Paschke, P. Popp y G. Schüürmann. *Fresenius J. Anal. Chem.* 360 (1998) 52.
- [240] V. López-Ávila, R. Young y W.F. Beckert. *J. High Resolut. Chromatogr.* 20 (1997) 487.
- [241] G.P. Jackson y A.R.J. Andrews. *Analyst.* 123 (1998) 1085.
- [242] J. Dugay, C. Miége y M.C. Hennion. *J. Chromatogr. A.* 795 (1998) 27.
- [243] C. Aguilar, S. Peñalver, E. Pocrull, F. Borrull y R.M. Marcé. *J. Chromatogr. A.* 795 (1998) 105.
- [244] C.W. Whang y J. Pawliszyn. *Annal. Commun.* 35 (1998) 353.
- [245] M. Moder, S. Schrader, U. Franck y P. Popp. *Fresenius J. Anal. Chem.* 357 (1997) 326.

- [246] K.D. Buchholz y J. Pawliszyn. *Anal. Chem.* 66 (1994) 160.
- [247] I. Valor, C. Cortada y J.C. Moltó. *J. High. Resolut. Chromatogr.* 472 (1996) 472.
- [248] H. Daimon y J. Pawliszyn. *Anal. Chem.* 34 (1997) 365.
- [249] Y. Yang, D.J. Miller y S.B. Hawthorne. *J. Chromatogr. A.* 800 (1998) 257.
- [250] H. Prosen y L. Zupancic-Kralj. *Trends in Anal. Chem.* 18 (1999) 272.
- [251] R. Doong y S.M. Chang. *Anal. Chem.* 72 (2000) 3647.
- [252] A. Berthod y C. García-Álvarez-Coque. "Micellar Liquid Chromatography", Marcel Dekker, Inc. New York, Basel (2000), Apéndice II.
- [253] J. Poerschmann, Z. Zhang, F.D. Kopinke y J. Pawliszyn. *Anal. Chem.* 69 (1997) 597.
- [254] K.G. Khaledi y E.D. Breyer. *Anal. Chem.* 61 (1989) 1040.
- [255] E.D. Breyer, J.K. Strasters y K.G. Khaledi. *Anal. Chem.* 63 (1961) 822.
- [256] L. Golberg. "Structure-activity correlation as a predictive tool in toxicology". L. Golberg (ed.), Hemisphere, Washington D.C., (1983).
- [257] C. Hansch. "Drug Desing". E.J. Ariens (ed.), Vol 1, Academic Press, New York (1971).
- [258] C. Hansch y A. Leo. "Substituted Constants for correlation analysis in chemistry and biology". Wilar-Interscience, New York, (1979).
- [259] K. Jinno y K. Kawasaki. *Chromatographia.* 17 (1983) 337.
- [260] S.A. Wise, W.F. Bonnet, F.R. Gunther y W.E. May. *J. of Chromatogr. Sci.* 19 (1981) 457.
- [261] V. González, M.A. Rodríguez-Delgado, M.J. Sánchez y F. García-Montelongo. *Chromatographia.* 42 (1992) 627.
- [262] A. Berthod y C. García-Álvarez-Coque. "Micellar Liquid Chromatography". Marcel Dekker, Inc. New York. Basel. (2000) pp. 293-342.
- [263] B. Froschl, G. Stangl y R. Niessner. *Fresenius J. Anal. Chem.* 357 (1997) 743.