



Memoria del trabajo de Fin de Grado

COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (PAHs) DE MUESTRAS AIRE (FILTROS PM10)

Ouafae El Karrat El Wardani

Grado de Química

Facultado de Ciencias

Año académico 2019-20

Palabras clave del trabajo:

PAHs, HPLC, extracción asistida microondas, extracción asistida ultrasonidos, filtros PM10

DNI del alumno: 43473562C

Trabajo tutelado por Laura Ferrer Trovato

Departamento de Química

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Resumen

La etapa del tratamiento de las muestras antes de ser analizadas es un paso crítico que tiene repercusión en los resultados. En la actualidad, uno de los métodos más utilizados para la extracción de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) es la extracción mediante ultrasonidos con una mezcla de diclorometano-hexano. En este trabajo se plantea otro método de extracción asistida por microondas, también propuesto por la norma UNE-EN-15549 "Método normalizado para la medición de la concentración de benzo(a)pireno en el aire ambiente", que es menos tedioso y utiliza menos disolventes que la extracción asistida por ultrasonidos. Así, el objetivo de este trabajo es comparar ambos protocolos de extracción para los PAHs identificados como contaminantes prioritarios por la EPA, en términos de eficiencias de extracción y límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).

Para la cuantificación de los PAHs se utilizó la técnica cromatográfica HPLC con detección por fluorescencia. El protocolo de extracción asistida por microondas (EAM) incluye una reducción del volumen con la ayuda de un rotavapor, hasta sequedad. Posteriormente, se reconstituye el residuo seco con hexano y se pasa por una columna de fraccionamiento para eliminar los compuestos alifáticos presentes en la muestra. Finalmente, se vuelve a llevar a sequedad y se reconstituye con acetonitrilo.

Los resultados de la EAM mostraron rendimientos de extracción aceptables (entre 50 y 101%). Además, es una metodología menos tediosa que el método con extracción por ultrasonidos y presenta LODs y LOQs en su gran mayoría, más bajos. Se puede afirmar que la EAM es más conveniente, con un menor tiempo de análisis, límites de detección más bajos, y reduce la cantidad de disolventes, siendo más amigable con el medio ambiente.

Palabras clave: PAHs, HPLC, extracción asistida microondas, extracción asistida ultrasonidos, filtros PM10

Abstract

The sample pre-treatment is a critical step that has an impact on the results. At present, one of the most widely used methods for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) is extraction by means of ultrasound with a dichloromethane-hexane mixture. In this work, another microwave-assisted extraction method is proposed, also proposed by the UNE-EN-15549 standard "Standard method for measuring the concentration of benzo(a)pyrene in ambient air", which is less tedious and decrease the use of solvents than ultrasonic assisted extraction. Thus, the objective of this work is to compare both extraction protocols for the PAHs, identified as priority pollutants by the EPA, in terms of extraction efficiencies and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ).

For the quantification of PAHs, HPLC chromatographic technique with fluorescence detection was used. The microwave-assisted extraction (MAE) protocol includes a volume reduction with the help of a rotary evaporator, until dry. Subsequently, the dry residue is reconstituted with hexane and passed through a fractionation column to eliminate the aliphatic compounds present in the sample. Finally, it is returned to dryness and reconstituted with acetonitrile.

The results of microwave-assisted extractions showed acceptable extraction yields (between 50 and 101%). Furthermore, it is a less tedious methodology than the ultrasound extraction method, and presents lowest LODs and LOQs, for the most of PAHs. It can be concluded that MAE is more convenient, with a shorter analysis time, lower detection limits, and reduces the amount of solvents, being more friendly to the environment.

Keywords: PAHs, HPLC, microwave assisted extraction, ultrasonic assisted extraction, PM10 filters

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	5
1.1	¿QUÉ SON LOS PAHS?	5
1.2	METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA EXTRACCIÓN DE LOS PAHS	7
1.3	OBJETIVOS	9
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
2.1	REACTIVOS Y MATERIAL.....	10
2.2	EQUIPOS.....	10
2.3	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	11
2.3.1	<i>Preparación de reactivos y del material.....</i>	<i>11</i>
2.3.2	<i>Curva de calibración.....</i>	<i>12</i>
2.3.3	<i>Ensayo con ambos métodos para determinar límites de detección y cuantificación.....</i>	<i>13</i>
2.3.4	<i>Ensayos con ambos métodos para establecer las eficiencias de extracción para cada PAHs... </i>	<i>15</i>
2.4	INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA	15
2.4.1	HPLC.....	15
2.4.2	Baño ultrasonido.....	17
2.4.3	Microondas	18
2.4.4	Cálculos.....	19
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
3.1	CURVAS DE CALIBRADO	22
3.2	LÍMITES DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN	24
3.3	EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE LOS PAHS DEL MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO CON AMBOS MÉTODOS.....	25
4.	CONCLUSIONES	30
5.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1. Introducción

1.1 ¿Qué son los PAHs?

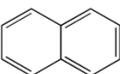
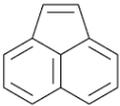
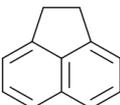
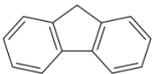
Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, por sus siglas en inglés) son un conjunto sustancias químicas que se forman como resultado de la combustión incompleta de la materia orgánica (carbón, petróleo, gas, basura, etc.), encontrándose ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Raramente se encuentran individualmente, siendo más común la presencia de mezclas de dos o más componentes¹.

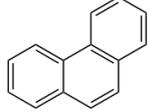
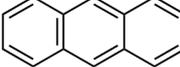
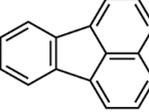
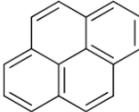
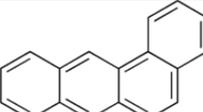
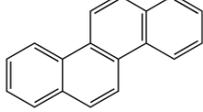
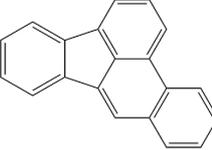
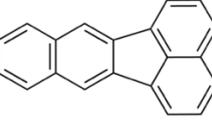
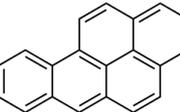
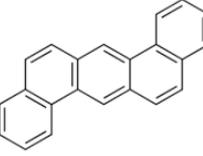
Según la bibliografía, los PAHs y los hidrocarburos alifáticos (CAHs, por sus siglas en inglés) son las sustancias más comunes en las áreas de campos petroleros y producción de petróleo. Las proporciones de las concentraciones de PAHs permiten identificar el origen de los contaminantes. Cuando se liberan en ambientes naturales, el conjunto inicial de PAHs sufre transformaciones debido a procesos químicos y fisicoquímicos, por la cuales se pueden activar o desactivar convirtiéndose en moléculas más tóxicas o menos.²

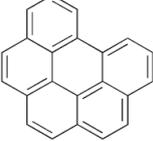
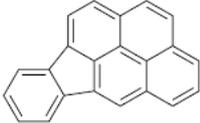
La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) ya en el año 1976 identificó 16 PAHs como contaminantes prioritarios, al comprobar sus efectos tóxicos, mutagénicos y/o cancerígenos para los organismos³. Estos 16 PAHs son motivo de preocupación para el medio ambiente debido a su prevalencia y persistencia en el medio ambiente⁴.

Estructuralmente, se trata de anillos aromáticos que no contienen heteroátomos ni sustitución. En la Tabla 1 se presentan los 16 PAHs identificados por la EPA como contaminantes prioritarios.

Tabla 1: 16 PAHs considerados contaminantes prioritarios por la EPA.⁵

PAHs	Abreviatura	Estructura	Número CAS
Naftaleno	NPH		91-20-3
Acenaftileno	ACE		208-96-8
Acenafteno	ACT		83-32-9
Fluoreno	FLU		86-73-7

Fenantreno	PHE		85-01-8
Antraceno	AN		120-12-7
Fluoranteno	FTH		206-44-0
Pireno	PY		129-00-0
Benzo[a]antraceno	BAN		56-55-3
Criseno	CHY		218-01-9
Benzo[b]fluoranteno	BBF		205-99-2
Benzo[k]fluoranteno	BKF		207-08-9
Benzo[a]pireno	BAP		50-32-8
Dibenzo[a,h]antraceno	DBAN		53-70-3

Benzo[g,h,i]perileno	BGP		191-24-2
Indeno(1,2,3cd)pireno	IND		193-39-5

Según su estructura y, en consecuencia, según sus propiedades químicas y fisicoquímicas, los PAHs se dividen en dos clases:

- PAHs de bajo peso molecular: están formados por 2-3 anillos (naftaleno, acenafteno, acenaftialino, fluoreno, fenantreno y antraceno y sus homólogos), se volatilizan fácilmente y son relativamente más solubles.
- PAHs de alto peso molecular: cuya estructura está compuesta por 4 o más anillos aromáticos (criseno, Ronen y otros), son más resistentes a las condiciones ambientales, no presentan toxicidad aguda, pero son cancerígenos. ⁶

La clasificación como contaminantes por parte de la EPA ha sido el impulsor principal para el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de PAHs. Los diferentes métodos que se aplican para su determinación se basan en las técnicas de separación de cromatografía líquida (LC, por sus siglas en inglés) y cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés) para separar cada uno de los PAHs. En LC, el esfuerzo se dedicó a la búsqueda de una fase estacionaria única capaz de lograr la separación de los 16 PAHs. Para los métodos de GC, el enfoque en el desarrollo de la fase estacionaria ha sido la separación de los isómeros críticos, logrando un alcance más amplio que los 16 PAHs propuestos por la EPA.

Los métodos actuales basados tanto en LC como en GC, que se utilizan en análisis de rutina para los 16 PAHs están bien establecidos; sin embargo, si se desean determinar PAHs de mayor masa molecular, o sustituidos con un grupo alquilo, se han desarrollado nuevos métodos analíticos. ⁷

1.2 Metodologías analíticas para la extracción de los PAHs

Todos los países de la Unión Europea se encuentran en la obligación de informar anualmente a la Comisión Europea sobre la calidad del aire en su territorio⁸ y para ello la Directiva europea 2004/107/CE ⁹ describe la metodología que se debe seguir para la medición de la concentración de Benzo(a)pireno (BAP) asociado a partículas del aire e indica las pautas a seguir descritas en la Norma UNE-EN 15549:2008 sobre un “Método normalizado para la medición de la concentración de benzo(a)pireno en el aire ambiente” ¹⁰. Entre ellas se describe como llevar a cabo:

- el muestreo de las partículas PM10, en las que se determinará el BAP

- la extracción de BAP de la muestra
- la determinación del BAP por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de fluorescencia o cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (CG-MS).

Este método impuesto por la directiva europea sólo es aplicable para la medición de BAP en un rango de concentración desde 0,04 ng/m³ a 20 ng/m³, cuyo límite superior normalmente no se excede en el ambiente.

Los PAHs son considerados en las partículas PM10, es decir en las partículas con un diámetro de 10 micrómetros (0,01 mm) o menos, debido a que por su tamaño estas partículas se encuentran comúnmente en el polvo y el humo formando parte del aire.¹¹

Esta norma propone diferentes métodos de extracción de la muestra:

- **Extracción por reflujo**

El filtro que contiene las partículas PM10 se corta en pequeñas porciones, se colocan en el fondo del matraz de un equipo de extracción por reflujo, y se mantiene la extracción con tolueno durante una hora. El extracto se concentra con la ayuda de una corriente de nitrógeno hasta 1 ml para el análisis.

- **Extracción por Soxhlet**

El filtro de partículas PM10 se coloca en equipos de extracción por Soxhlet utilizando tolueno como extractante durante un mínimo de 20 h. Cada equipo de extracción se envuelve en papel de aluminio para reducir la cantidad de luz, y así disminuir el tiempo de extracción. Cuando se ha enfriado el disolvente se vierte al matraz de fondo redondo. El extracto se concentra con nitrógeno y se analiza.

- **Extracción por microondas**

El filtro que contiene las partículas PM10 se corta en pequeñas porciones que se transfieren a vasos de teflón y se le añade una mezcla de hexano/acetona. Para asegurar una extracción correcta se siguen las instrucciones del fabricante del sistema de digestión por microondas. Se dejan enfriar estos vasos a temperatura ambiente, después se filtran los extractos y se concentran con nitrógeno. Para el análisis por HPLC con detección por fluorescencia (DFL). El extracto se disuelve con 1 ml de acetonitrilo.

- **Extracción acelerada por disolvente**

El filtro de PM10 se coloca en el recipiente de extracción y se extrae con diclorometano a 120°C durante 5 min y a una presión de 140 bar. La extracción de una misma alícuota se realiza por triplicado. Los extractos resultantes se combinan y se concentra con nitrógeno hasta que quede 1 ml y se analiza por CG-MS o HPLC-DFL.

- **Extracción por ultrasonidos**

La extracción se lleva a cabo con una mezcla de diclorometano-hexano mediante ultrasonidos. El protocolo incluye luego de la extracción, una reducción de volumen con la ayuda de un rotavapor hasta sequedad. Posteriormente, se reconstituye el residuo seco con hexano y se pasa por una columna de fraccionamiento para eliminar los compuestos alifáticos presentes en la muestra. Finalmente, se vuelve a llevar a sequedad y se reconstruye con acetonitrilo para cuantificar los PAHs por HPLC con detección por fluorescencia.

Considerando que la etapa del tratamiento de las muestras antes de ser analizadas es un paso crítico que tiene repercusión en los resultados, cada laboratorio selecciona de entre los métodos de extracción propuestos por la norma, aquel que mejor se adapte a su infraestructura y disponibilidad de equipos. En este trabajo se comparará a dos de ellos: la extracción asistida por microondas (EAM) y la extracción por ultrasonidos (EAU). La EAU es la que se utiliza en el laboratorio del grupo de Química Analítica, Automatización y Medio Ambiente para análisis de rutina, pero cómo se podrá ver más adelante es un procedimiento muy tedioso, en el cual se emplean disolventes poco amigables con el medio ambiente. Por este motivo, se han propuesto poner a punto el método de extracción por microondas ya que se reduce el tiempo para la preparación de las muestras y se utilizan disolventes que son menos agresivos.

1.3 Objetivos

Así, el objetivo de este trabajo de fin de grado es comparar dos protocolos de extracción, por ultrasonidos y por microondas, para 15 PAHs (todos los PAHs identificados como contaminantes prioritarios por la EPA a excepción del Acenafteno (ACT) que no tiene propiedades fluorescentes) en términos de eficiencias de extracción y límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ). Además, se pretende determinar el benzo(e)pireno (BEP) y calcular su LOD y LOQ.

Para desarrollar el proyecto propuesto se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Establecer la curva de calibrado para cada PAH
- Calcular el LOD y el LOQ de cada PAH
- Analizar una muestra de referencia certificada (CRM, por sus siglas en inglés) mediante HPLC-DFL para establecer las eficiencias de extracción para cada uno de los PAHs.

2. Materiales y métodos

2.1 Reactivos y material

- **PAH Calibration Mix:** Acenaphthene, Acenaphthylene, Anthracene, Benz[a]anthracene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[k]fluoranthene, Benzo[ghi]perylene, Benzo[a]pyrene, Chrysene, Dibenz[a,h]anthracene, Fluoranthene, Fluorene, Indeno[1,2,3-cd]pyrene, Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene (cóctel patrón de calibración, Supelco)
- **1 Benzo[e]pyrene** (25 mg, 99%, Aldrich)
- **Metilnaftaleno** (Patrón interno, Sigma-Aldrich)
- **Material de referencia certificado** (CRM-47940). Su composición se especifica en el anexo. Debido a la falta de disponibilidad de un CRM de partículas PM10, se procedió al análisis de un CRM de suelo, por considerarse la matriz más similar disponible.
- **Mezcla crómica:** esta mezcla se prepara disolviendo 50 g de dicromato de potasio en 150 ml de agua caliente. Se deja enfriar, a continuación, se agregan despacio y con agitación constante, 200 ml de ácido sulfúrico. Luego se añade un exceso suficiente de ácido sulfúrico para disolver completamente el dicromato. Se guarda la disolución en un frasco de vidrio.
- **Acetona** (99,8%, Scharlau, for GC residue analysis)
- **Diclorometano** (99,9%, for GC residue analysis stabilized with approx. 50 µg/ml of amylene)
- **Alúmina** (óxido de aluminio 90 activo, básico, 0,063-0,200mm, Merck)
- **Sílica gel** (high-purity grade, 40, 70-230 mesh, for column chromatography)
- **Hexano** (96%, for GC residue analysis.)
- **Lana de vidrio.** La lana de vidrio ha pasado por un proceso de purificación previo. Para evitar contaminación por PAHs, se ha llevado a cabo una extracción de los mismo con un equipo Soxhlet empleando como disolvente una disolución de diclorometano/hexano 1:2)
- **Acetonitrilo** (pureza HPLC, 100 %, VWR, Chemicals)
- **Metanol** (HPLC grade ACS ISO UV-VIS K.F.)
- **Agua ultrapura calidad Milli-Q** (obtenida con un equipo Millipore Direct-8)
- **Filtros de fibra de cuarzo** de 1,6 µm tamaño de poro, 150 mm de diámetro (ACEFESA)

2.2 Equipos

- HPLC (JASCO)
- Baño térmico (SELECTA, UNIVEBA-400)

- Bomba del vacío (KNF, LABOPORT N810)
- Controlador de la presión bomba de vacío (vacuubrand, CVC 3000)
- Baño de ultrasonido (JP SELECTA)
- Mufla (J.P. SELECTA-HRN)
- Equipo de extracción en Soxhlet (ANORSA)
- Microondas (MILESTONE, Ethos Easy)
- Rotavapor (BUCHI, ROTAVAPOR-R-210)

2.3 Metodología experimental

Todo el procedimiento experimental se realiza siguiendo el protocolo establecido por Norma UNE-EN 15549:2008.

2.3.1 Preparación de reactivos y del material

– Preparación de filtros

Con el objetivo de conocer si los reactivos y/o el material utilizado aportan PAHs al analizar las muestras de filtros de partículas PM10, y además realizar los blancos para los ensayos para establecer los LODs y de los LOQs, éstos se someten al mismo pretratamiento que los filtros de muestreo, se envuelven en papel de aluminio y se llevan a la mufla durante 4 h a 350° C.

– Preparación y limpieza del material

Todo el material que se utiliza es de vidrio, para evitar que los compuestos orgánicos y especialmente los PAHs se adhieran a la superficie. Para la limpieza del material, primero se enjuaga con agua Milli-Q y una vez seco, se mufla durante 4 h a una temperatura de 500° C para eliminar cualquier tipo de sustancia orgánica que pudiera contaminar la muestra. Se deja enfriar dentro de la mufla hasta temperatura ambiente.

Las columnas de fraccionamiento (que también son de vidrio) no se muflan, sino que se colocan en una mezcla crómica un mínimo de 4h, se enjuagan con agua Milli-Q y se tapa la boca de la columna con papel de aluminio para evitar que se contaminen con polvo. Una vez que están totalmente secas ya se pueden emplear.

– Preparación de las disoluciones

Para la preparación de la fase móvil se empleó una disolución de agua Milli-Q:acetonitrilo 60:40 (v/v).

Para las extracciones en el sistema de ultrasonidos se emplea una disolución de diclorometano:hexano en una proporción 60:40 (v/v) y para la extracción por microondas se utiliza una mezcla de hexano:acetona con una proporción 50:50 (v/v).

– Purificación de la alúmina y la sílica

Para la purificación de la alúmina y la sílica se ha utilizado la extracción por Soxhlet. En primer lugar, se hace el montaje (Figura 1) dentro de la campana extractora.

Los reactivos se introducen en dedales que van dentro del Soxhlet, se llena un balón de fondo redondo con una disolución de diclorometano:hexano con una proporción 2:1 (v/v) y se introducen unas bolas de cristal para la ebullición.

Se deja unas 4 h recirculando. Después se colocan los dedales en la estufa hasta que se sequen. Una vez secos, se coloca el contenido en un vaso de precipitado para la sílica, y en una cápsula de porcelana para la alúmina. Se introducen los reactivos en recipientes de diferente material ya que se van a exponer a condiciones diferentes: la alúmina se colocará en la mufla durante 4 h a 350° C, mientras que la sílica se colocará unas 12 h en la estufa a 110° C. Para finalizar, se añade agua en una cantidad de 5% del peso total de reactivo purificado, y se reserva en recipientes herméticos.

La lana de vidrio empleada en este trabajo también ha pasado por el mismo proceso que la alúmina y la sílica.



Figura 1: Equipo de extracción Soxhlet.

2.3.2 Curva de calibración

Para realizar la curva de calibrado, se preparan disoluciones de patrón de concentraciones crecientes. Se partió de un cóctel patrón que contiene la mayoría de los PAH, excepto el BEP, en una concentración de 10 mg/l en acetonitrilo. Se prepara una disolución de BEP de 10 mg/l en acetonitrilo.

La curva de calibrado se compone de los siguientes puntos: 1 (P1), 0,5 (P2), 0,25 (P3), 0,1 (P4), 0,05 (P5), 0,025 (P6), 0,01 (P7), 0,005 (P8) mg/l. Para ello se prepararon disoluciones de 4 ml para cada punto de la recta. Los patrones 1 al 5 se prepararon a partir de la disolución madre de 10 mg/l, mientras que los patrones 6 al 8 se prepararon a partir de la disolución del patrón 4 ya que estaba más diluido y no sería necesario utilizar mucho volumen. Se realiza

el mismo procedimiento para la preparación de los patrones de BEP, se parte de la disolución madre de 10 mg/l preparada anteriormente.

Como patrón interno se utiliza el 1-metilnaftaleno que se comercializa en ampollas de 100 mg. Se parte de una ampolla de patrón y se disuelve en 10 ml, de esta disolución se van haciendo los patrones intermedios hasta preparar uno de 10 mg/l. De esta última disolución se añade el volumen necesario en cada uno de los patrones, de manera que la disolución final contenga una concentración de patrón interno de 0,25 mg/l.

Antes de inyectar la muestra en el HPLC, se inyectan al menos 2 patrones en cada análisis para corroborar el buen funcionamiento del mismo.

2.3.3 Ensayo con ambos métodos para determinar límites de detección y cuantificación

– Preparación de blancos con extracción por ultrasonidos

Para la preparación de los blancos por el método de extracción por ultrasonidos, en primer lugar, se corta medio filtro PM10 en cuadraditos pequeños y se colocan dentro de un matraz redondo de 100 ml y seguidamente se introducen 60 ml de la disolución de diclorometano:hexano (60:40). A continuación, se introduce la mezcla en un baño de ultrasonidos durante 15 min. Se decanta el líquido en un matraz de 250 ml. Se repite la extracción con 60 ml de diclorometano:hexano (60:40) dos veces más hasta obtener 180 ml de extracto.

Se lleva el extracto resultante de las tres extracciones, casi a sequedad en el rotavapor (Figura 2), en baño termostatzado a 50° C, en vacío.

Se recogen los pocos mililitros que queden y se trasvasan a un vial largo, a continuación, se lleva el extracto a sequedad en corriente de N₂ y se re-disuelve el residuo con 0,5 ml de hexano.

A continuación, se procede a la preparación de las columnas de fraccionamiento para llevar a cabo el arrastre de los 16 PAHs. Se coloca en la parte inferior una bola de lana de vidrio y se limpia la columna dos veces con hexano. Después se añade 1 g de sílica en la parte inferior y 1 g de alúmina en la parte superior, quedando los dos reactivos sumergidos.

Se eluye la muestra con 3 ml de hexano, sin dejar que el nivel de la fase líquida esté por debajo de la fase sólida. En esta etapa quedan retenidos en la columna los hidrocarburos alifáticos. Luego se pasan 7 ml de diclorometano:hexano (60:40) que eluye a los PAHs y se recogen en un vial mediano, para llevarlos a sequedad en corriente de nitrógeno.

Finalmente, se reconstituye con 1ml de acetonitrilo que contiene el patrón interno, y se trasvasa a un vial de HPLC. Se reserva en nevera hasta su análisis.

En este trabajo se ha repetido este procedimiento 16 veces, obteniendo 16 muestras de blancos.

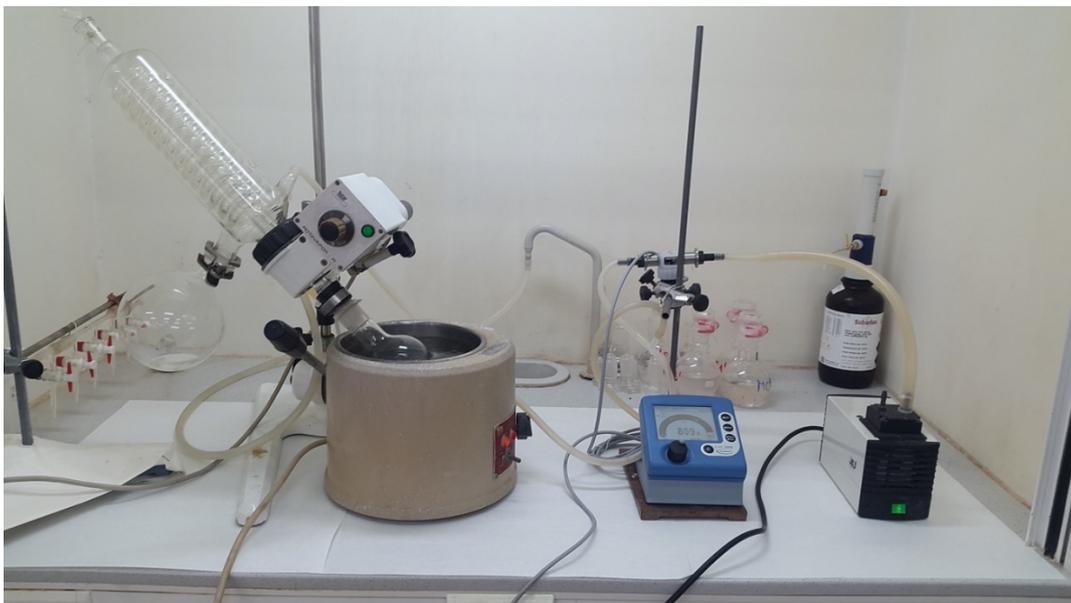


Figura 2: Montaje del rotavapor para evaporar el extracto.

– **Preparación de blancos mediante extracción por microondas**

Para la preparación de los blancos por el método de digestión por microondas, en primer lugar, se corta medio filtro PM10 en cuadraditos pequeños, y se colocan dentro de un vaso de teflón (PTFE) y seguidamente se introducen 30 ml de hexano:acetona con una proporción 50:50 (v/v) y se lleva a cabo la extracción. La extracción se realizó en una unidad de extracción por microondas, ETHOS de Milestone, en la cual como máximo se pueden extraer hasta 8 muestras a la vez.

Las condiciones recomendadas por el fabricante del equipo para la extracción de PAHs de sedimentos (matriz más similar a las partículas PM10) se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: Programa del microondas para la extracción de PAHs de muestras de sedimentos.

Tiempo (min)	Potencia (W)	Temperatura (°C)	Presión (bar)
10	800	Ambiente - 120	Ambiente - 20
20	800	120	20

Seguidamente, una vez que todos los vasos están a temperatura ambiente, se trasvasa el extracto a un matraz de redondo de 100 ml y se evapora en el rotavapor hasta que queden pocos mililitros y se pasan a un vial largo.

En este caso para filtrar los extractos se han utilizado pipetas Pasteur mufladas como microcolumnas. Para ello, se introdujo lana de vidrio en la parte inferior de la pipeta y se pasó el extracto para filtrarlo. Se recoge el filtrado en un vial mediano y se lleva hasta sequedad en corriente de N₂. El residuo se disuelve con 1 ml de acetonitrilo, que contiene el patrón interno, se trasvasa a un vial de HPLC y se reserva en nevera hasta su análisis.

2.3.4 Ensayos con ambos métodos para establecer las eficiencias de extracción para cada PAHs

Para establecer la eficiencia de extracción de los PAHs con los dos métodos de extracción se realizó el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior (2.3.3) con la diferencia que se analiza material de referencia certificado junto con filtros, en vez de analizar solo filtros.

– Extracción asistida por ultrasonidos

Para la extracción de PAHs de la muestra de CRM, en primer lugar, se pesó 1 g de suelo al que se añadió medio filtro PM10 troceado y 60 ml de la disolución de diclorometano:hexano (60:40). A continuación, se introdujo la mezcla en un baño de ultrasonidos durante 15 min. Se decantó el líquido en un matraz de 250 ml. Se repitió la extracción con 60 ml de diclorometano/hexano (60:40) dos veces más hasta obtener unos 180 ml de extracto.

Luego se continúa con el mismo procedimiento que esta descrito en el apartado 2.3.3, “*Preparación de blancos con extracción por ultrasonidos*”.

– Extracción asistida por microondas

Por lo que se refiere a la extracción por microondas, se pesa dentro del vaso de teflón 1 g de suelo al que se le añadieron 30 ml de la disolución de hexano:acetona con una proporción 50:50 (v/v) y medio filtro PM10. Se continúa con el procedimiento descrito en el apartado 2.3.3 “*Preparación de blancos mediante extracción por microondas*”.

2.4 Instrumentación analítica

2.4.1 HPLC

Para realizar el análisis de los extractos y determinar la concentración de cada uno de los PAHs en las muestras, se llevó a cabo la separación de los PAHs mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución, y se determinaron los PAHs mediante fluorescencia.

El equipo con el cual se ha trabajado se compone de los siguientes dispositivos (Figura 3):

- A. **Ordenador**, contiene el software necesario para controlar el equipo (programa ChromNAV Control Center).
- B. **Eluyentes**, agua Milli-Q/acetonitrilo 60:40 (v/v) y acetonitrilo pureza HPLC.
- C. **Bombas** JASCO, PU-2089 Plus, Quaternary Gradient Pump.
- D. **Detector fluorimétrico** JASCO, modelo FP-2020 Intelligent Fluorescence Detector.
- E. **Automuestreador** JASCO, AS-2055 plus Intelligent Sampler.
- F. **Columna cromatográfica** Pursuit 3 PAH, Reverse Phase C18 con unas dimensiones de 4,6 mm de diámetro y 15 cm de longitud. La columna se encuentra dentro de un equipo WATERS que se encarga de mantener constante la temperatura de la columna.

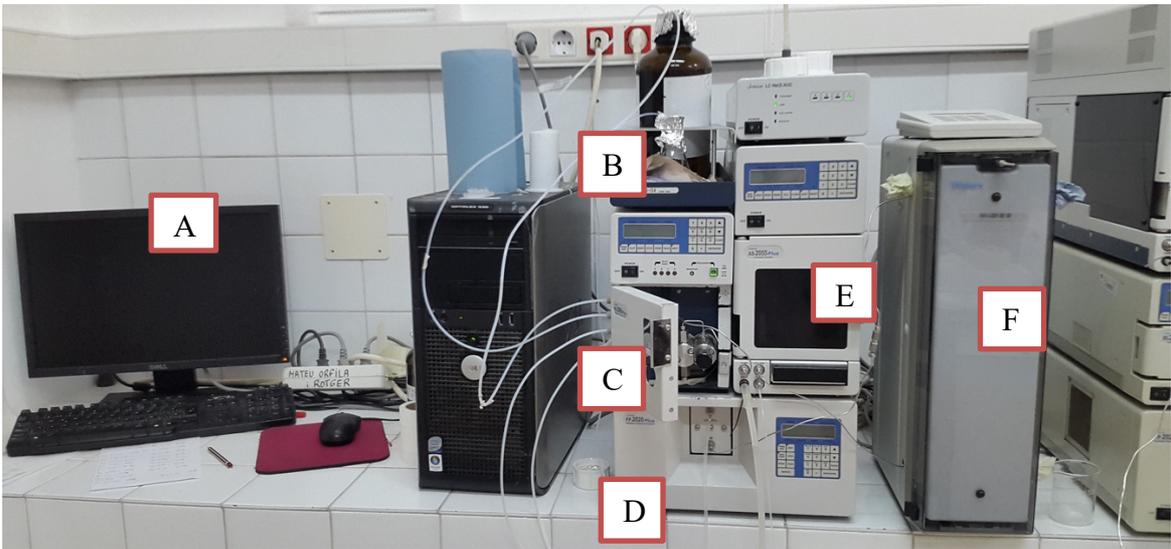


Figura 3: Equipo HPLC.

Para la separación cromatográfica se utilizó una fase reversa C18 y la elución por gradiente. La elución en gradiente consistió en una fase móvil donde la relación agua:acetonitrilo, es decir la polaridad, iba disminuyendo con el tiempo.

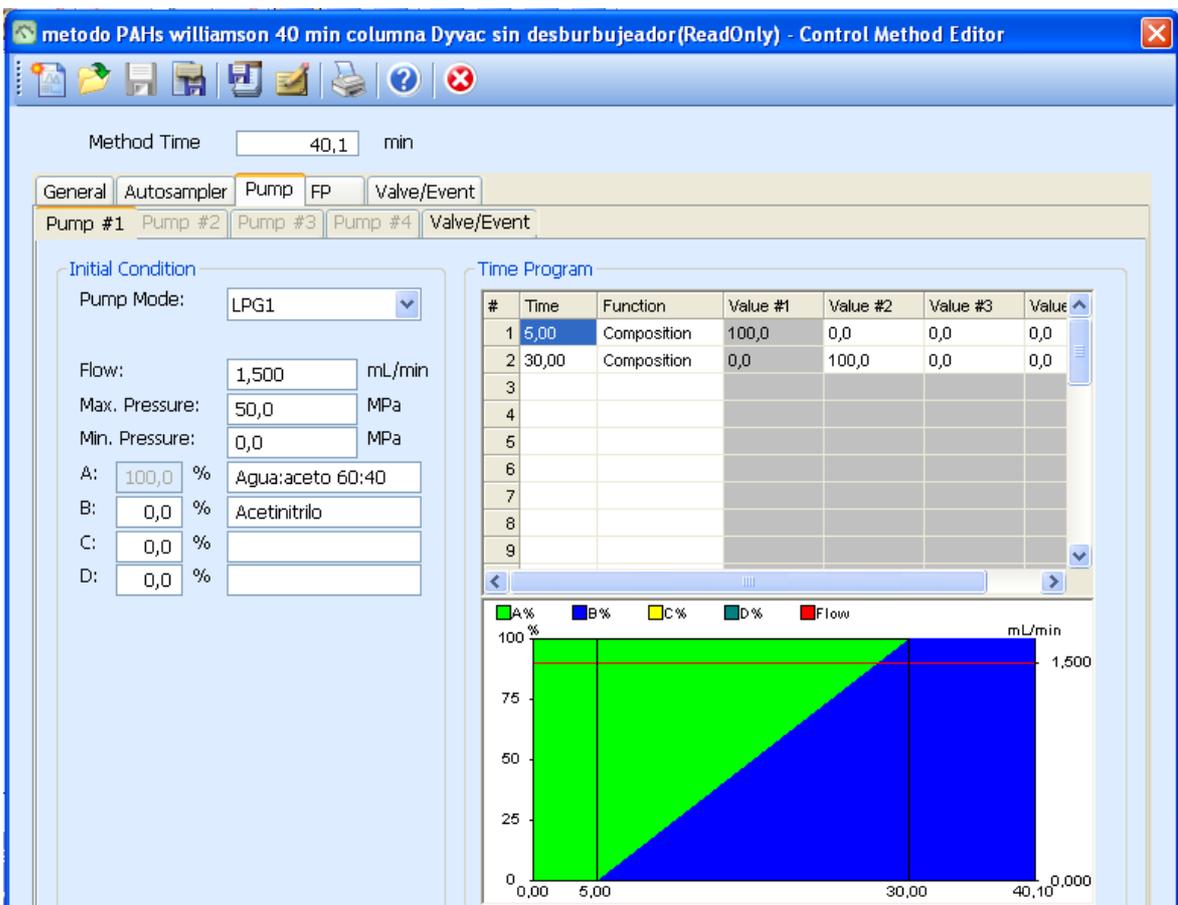


Figura 4: Método utilizado en el programa del HPLC.

Como podemos ver en la Figura 4, en el minuto 5 empieza la elución en gradiente y acaba en el minuto 30, donde a partir de entonces solo se eluye con acetonitrilo. Con este método conseguimos que los PAHs más hidrofílicos eluyan cuando la concentración de agua es mayor y los compuestos más hidrofóbicos eluyan cuando la concentración de acetonitrilo es mayor, por lo que se podrán detectar y cuantificar cada uno de los PAHs con una resolución adecuada.

Las muestras son introducidas en la fase móvil gracias a la inyección automática que incorpora el equipo, utilizando una microjeringa de alta precisión. La fase móvil (que ya incluye la muestra) es impulsada a través de la columna cromatográfica gracias a una bomba que mantiene el flujo constante (1,5 ml/min).

A la salida de la columna se encuentra el detector, el cual está configurado para diferentes longitudes de onda en función del tiempo (Tabla 3), ya que de esta manera se aumenta la sensibilidad del método.

Tabla 3: Longitud de onda a las que se analizó los distintos PAHs.

PAH	λ excitación (nm)	λ emisión (nm)	Tiempo (min)
NPH, ACE, FLU	280	355	0-12,2
PHE, AN, FTH, PY	250	420	12,2-18
BAN, CHY, BEP, BBF	270	390	18-23,1
BKF, BAP, DBAN, BGP	290	410	23,1-28,5
IND	300	465	28,5-40

λ : Longitud de onda

Aunque el fabricante del equipo recomienda unas condiciones, el método se tiene que optimizar. Es muy conveniente realizar esta optimización con un patrón, antes de pasar las muestras, ya que de esta manera un parámetro determinante cómo es el tiempo de retención, se ajusta con el objetivo de obtener picos bien definidos, es decir, que no se dividan ni solapen, y así una elevada resolución.

2.4.2 Baño ultrasonido

El baño de ultrasonidos (Figura 5) produce ondas que provocan una presión a través de un líquido, en este caso diclorometano/hexano, y hacen que la distancia entre las moléculas del mismo sea mayor a la mínima distancia molecular, lo que origina que las fuerzas de cohesión se rompan y se cree un vacío. A este vacío es a lo que se denomina burbujas de cavitación. Las colisiones entre las burbujas de cavitación son las que hacen posible los efectos químicos y mecánicos de la energía de ultrasonido. Cada choque puede ser considerado como un microreactor en donde se crean instantáneamente temperaturas y presiones muy altas.¹²



Figura 5: Baño ultrasonido marca SELECTA

Entre los parámetros que afectan en la extracción asistida por ultrasonido, se pueden destacar:

- Volumen de muestra
- Tamaño de partícula de la muestra
- Solvente de extracción
- Frecuencia de sonicado
- Tiempo de extracción
- Temperatura de extracción

2.4.3 Microondas

La extracción se realizó en una unidad de extracción por microondas, ETHOS de Milestone (Figura 6), con el rotor SK-12. Este equipo se utiliza para extraer compuestos orgánicos insolubles o ligeramente solubles en agua de muestras de suelo, arcilla, sedimentos, lodos y residuos sólidos. En su procedimiento utiliza energía de microondas para elevar las condiciones de temperatura y presión en un recipiente que contiene la muestra y los disolventes orgánicos para lograr la extracción del analito de interés. En este caso empleamos 1 g de suelo en 30 ml de acetona:hexano 50:50 (v/v).¹³

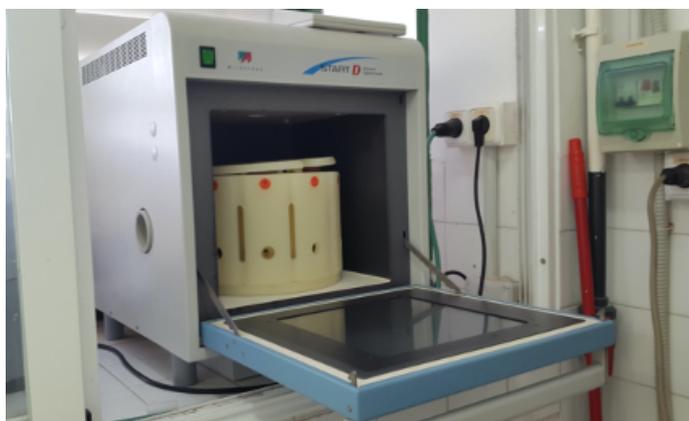


Figura 6: Equipo de extracción por microondas.

El programa de microondas para la extracción de PAHs de muestras de sedimentos es el que se detalla en la Tabla 2 y el perfil de temperatura que sigue se indica en la Figura 7.

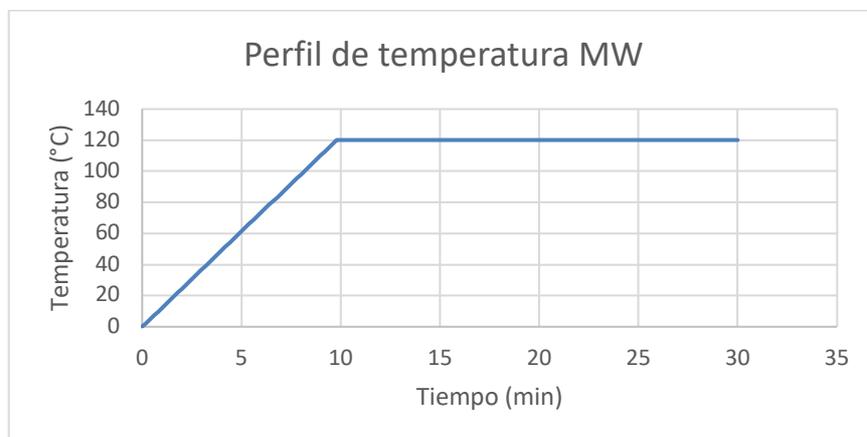


Figura 7: Perfil de temperatura del microondas.

2.4.4 Cálculos

- **Cuantificación de los PAHs**

En primer lugar, se obtiene el cromatograma y se integran las áreas de cada pico. En este caso, se integrarán 15 picos correspondientes a los PAHs del cóctel patrón y un pico del patrón interno (p.i.).

Luego, en una hoja de cálculo se obtienen las rectas de calibrado de cada PAHs ($y=a+bx$), graficando la concentración del PAHs (eje x) en función de la señal analítica, calculada como la ratio entre el área del analito sobre el área del p.i.

Con la ecuación de la recta de calibrado se obtiene la concentración (x_m) de cada PAH por interpolación, a partir de la señal analítica de la muestra (y_m), según $x_m = (y_m - a) / b$

Por último, se calcula el contenido de cada PAH en la muestra, considerando la cantidad de muestra analizada y las diluciones, mediante factores de conversión.

Para calcular el rendimiento de extracción, se considera el porcentaje de concentración obtenido respecto a la concentración teórica del material de referencia certificado.

- **Límite de detección y de cuantificación**

Para el cálculo de los límites de detección (**LOD**) y de cuantificación (**LOQ**) de los PAHs se lleva a cabo el análisis cromatográfico de 10 blancos. Estos cálculos se realizaron según los criterios establecidos por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés), los cuales se detallan a continuación ¹⁴:

- **Límite de detección:** es la concentración más baja del analito de interés que puede diferenciarse estadísticamente de la concentración de los blancos. Se

realizan al menos 10 medidas independientes del blanco para obtener la desviación estándar de la señal del blanco.

El LOD se calcula como 3 veces la desviación estándar del blanco, sobre la pendiente de la curva de calibración.

$$LOD = \frac{3 \cdot s_{blancos}}{b}$$

Donde,

s_{10} : desviación estándar de 10 blancos.

b: pendiente de la recta de calibrado

- **Límite de cuantificación:** es la concentración más baja del analito de interés que se cuantifica con certeza estadística.

El LOQ se calcula como 10 veces la desviación estándar del blanco, sobre la pendiente de la curva de calibración.

$$LOQ = \frac{10 \cdot s_{blancos}}{b}$$

Donde,

$s_{blancos}$: desviación estándar de 10 blancos.

b: pendiente de la recta de calibrado

La desviación estándar ($s_{blancos}$) de la señal analítica (área blanco/p.i.) de los diez blancos se obtuvo con la macro de Excel llamada “DESVEST”.

3. Resultados y Discusión

Como ya se comentó en el apartado de instrumentación analítica, antes de analizar una muestra se analiza un patrón para verificar el buen funcionamiento del equipo. En este caso se inyectó un patrón con una concentración de 0,1 mg/l y se obtuvieron los picos que se muestran en la Figura 8.

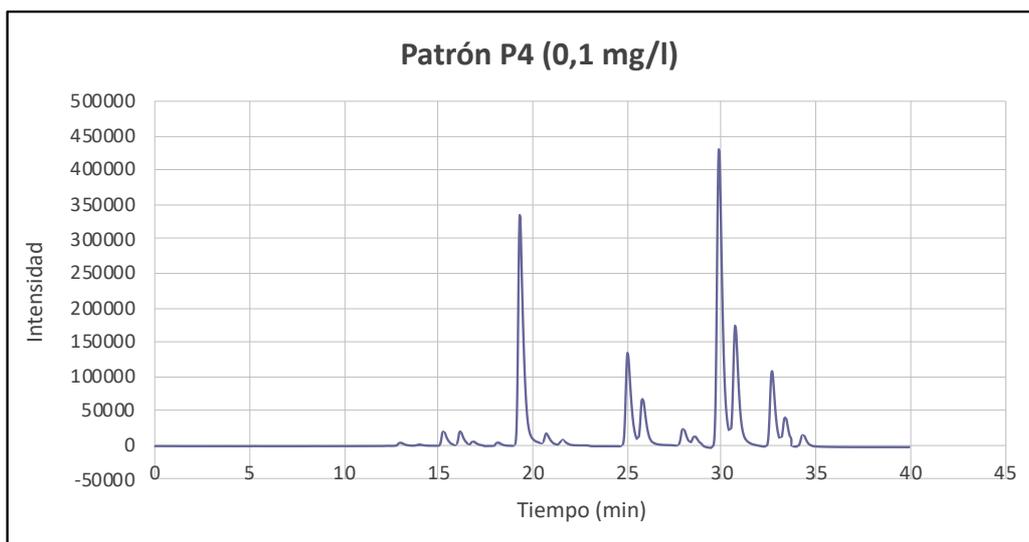


Figura 8: Cromatograma del patrón con una concentración de 0,1mg/l.

Se pueden identificar los picos gracias al tiempo de retención, es decir, cada PAHs tiene un tiempo de retención característico, y esto permite identificar que PAHs contiene una muestra.

Tabla 4: Tiempo de retención para cada PAHs.

PAH	Tiempo de retención (min)
NPH	12,3
p.i.	14,7
ACE	15,6
FLU	16,4
PHE	17,7
AN	18,8
FTH	20,2
PY	21,1
BAN	24,5
CHY	25,4
BEP	27,5
BBF	28,3
BKF	29,4
BAP	30,4
DBAN	32,3
BGP	33,1
IND	34,0

3.1 Curvas de calibrado

Después de analizar los patrones con el cromatógrafo, se representó la señal analítica (área de cada patrón/área p.i.) frente a la concentración de los patrones, obteniendo las ecuaciones de las rectas y los coeficientes de determinación (R^2) y de correlación lineal (r). En la Figuras 9, 10 y 11 se muestran algunas de estas representaciones.

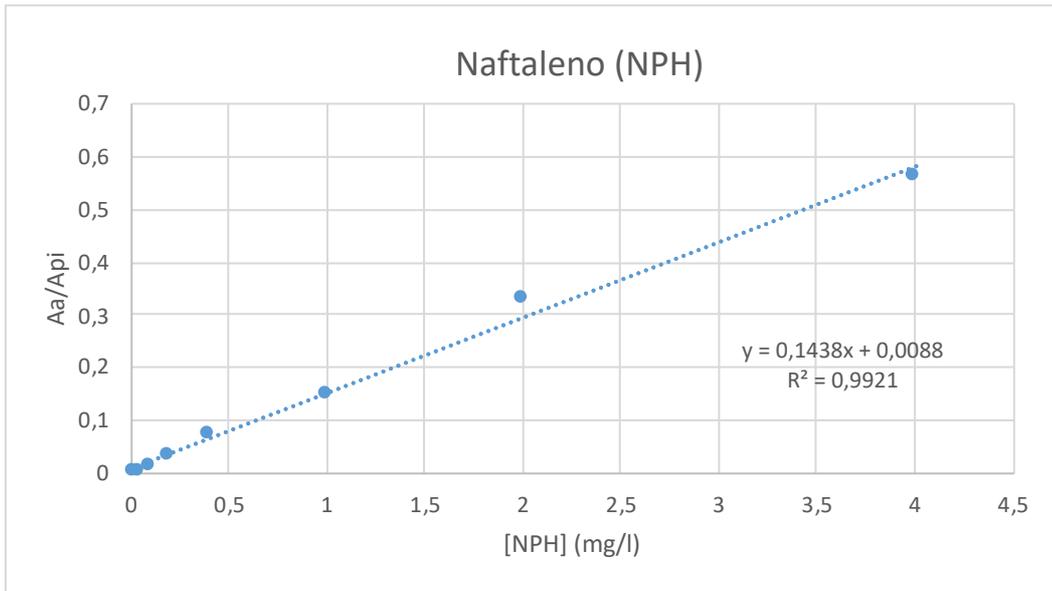


Figura 9: Recta de calibrado del NPH

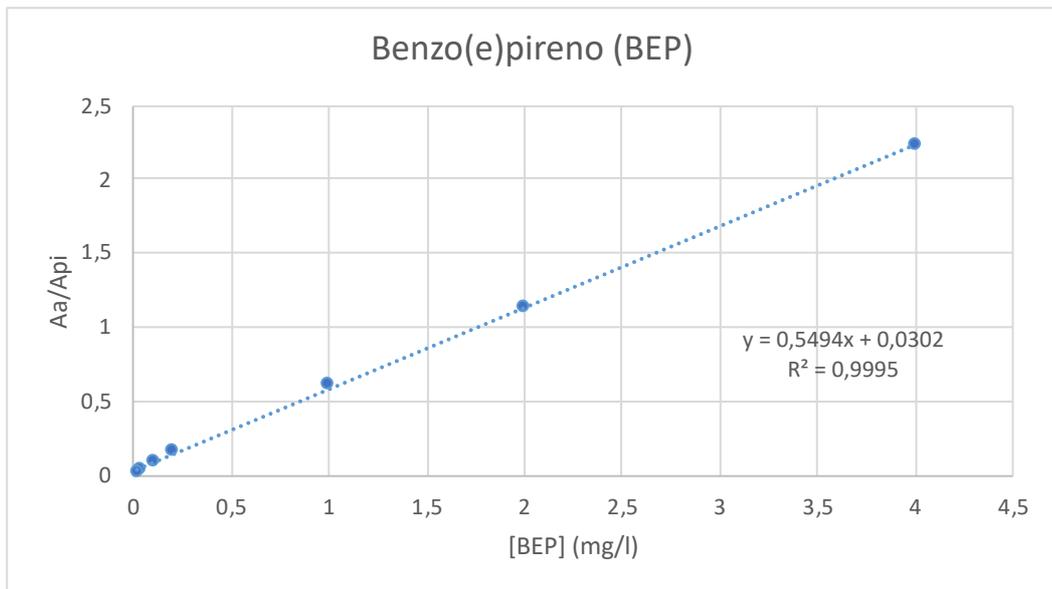


Figura 10: Recta de calibrado del BEP

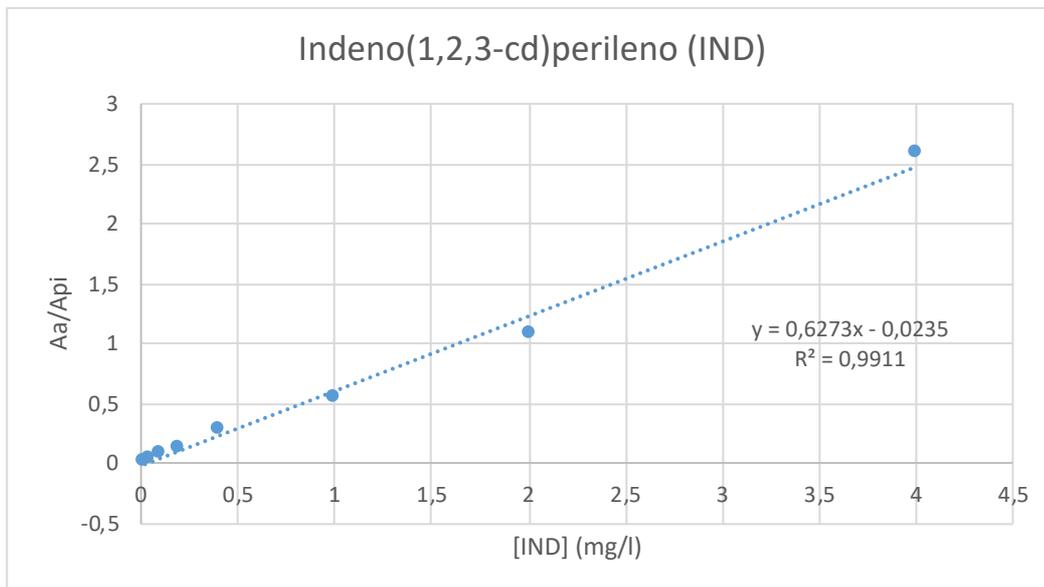


Figura 11: Recta de calibrado IND.

En la Tabla 5 se presentan las ecuaciones de las rectas de calibrado y los valores de los coeficientes de determinación y de correlación lineal de los PAHs estudiados. Como puede observarse, el ajuste de las concentraciones a la señal analítica es satisfactorio en todos los casos ($r > 0,99$).

Tabla 5: Ecuación de la recta, coeficientes de determinación (R^2) y de correlación lineal (r).

PAHs	Ecuación de la recta	R^2	r
NPH	$y = 0,1438x + 0,0088$	0,9921	0,9960
ACE	$y = 0,4768x + 0,0091$	0,9995	0,9997
FLU	$y = 0,115x + 0,0036$	0,9946	0,9973
PHE	$y = 0,1593x - 0,0072$	0,9976	0,9988
AN	$y = 7,9778x + 0,5211$	0,9982	0,9991
FTH	$y = 0,3801x + 0,0101$	0,9965	0,9982
PY	$y = 0,1835x + 0,0032$	0,9989	0,9994
BAN	$y = 3,2789x + 0,1692$	0,9947	0,9973
CHY	$y = 1,6218x + 0,1691$	0,9891	0,9945
BBF	$y = 0,2223x + 0,0353$	0,9903	0,9951
BKF	$y = 13,259x - 0,3661$	0,9983	0,9991
BAP	$y = 3,5639x + 0,1309$	0,9969	0,9984
DBAN	$y = 2,5827x + 0,0985$	0,9969	0,9984
BGP	$y = 0,8398x + 0,0149$	0,9990	0,9995
IND	$y = 0,6273x + 0,0235$	0,9911	0,9955
BEP	$y = 0,5494x + 0,0302$	0,9995	0,9997

3.2 Límites de detección y de cuantificación

En las Figuras 12 y 13 se puede observar que los cromatogramas de los blancos obtenidos con EAU son más limpios que aquellos obtenidos por EAM, ya que en éste aparecen unos picos al principio del cromatograma que no se corresponden con ninguno de los PAHs que se están determinando.

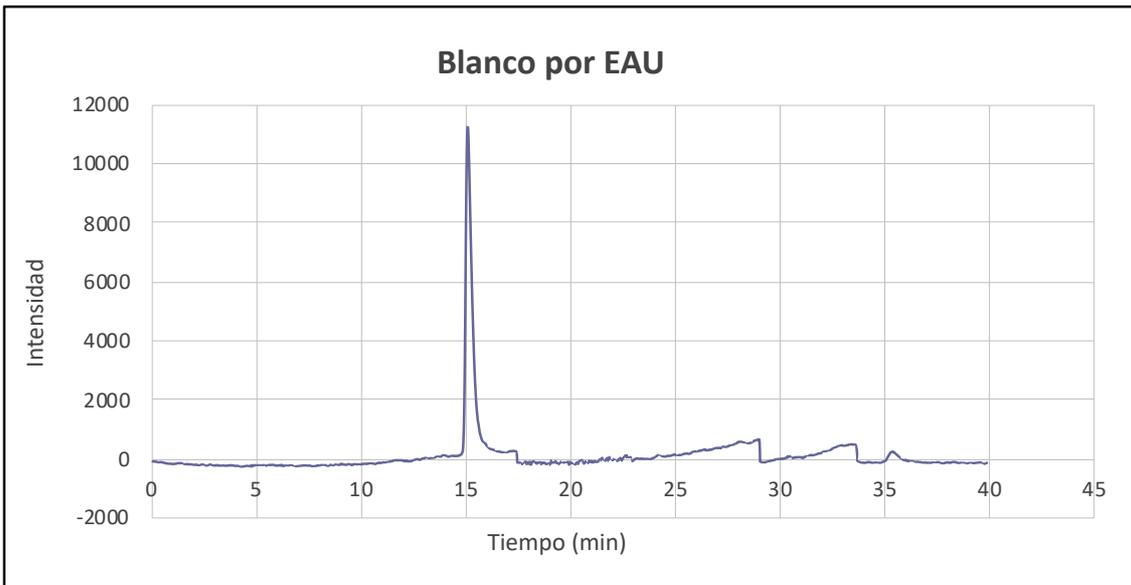


Figura 12: Cromatograma del blanco obtenido por EAU.

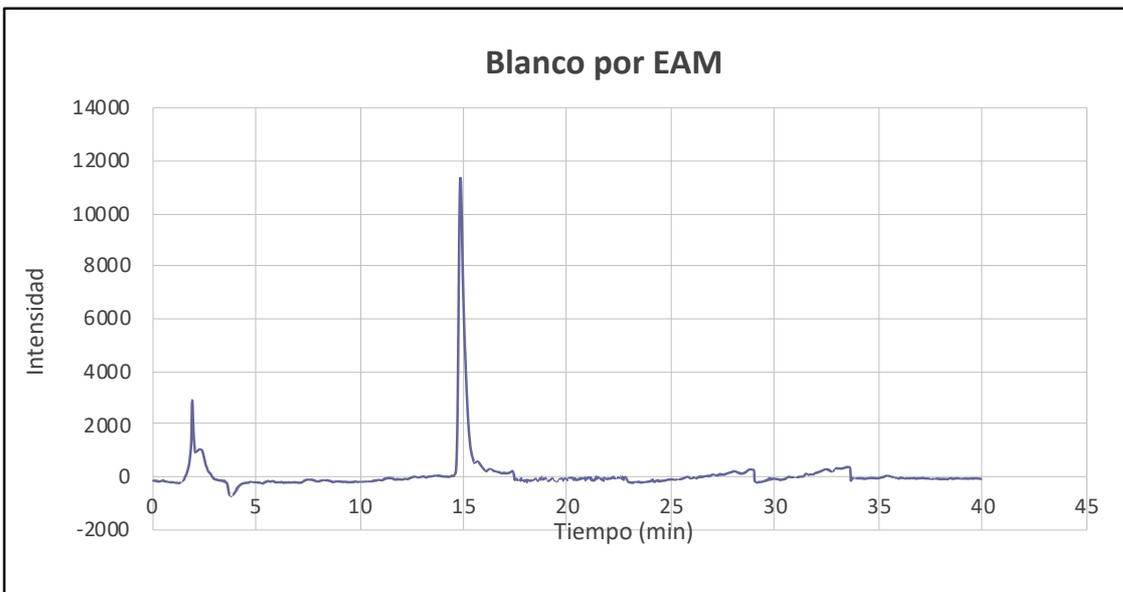


Figura 13: Cromatograma del blanco obtenido por EAM.

Los LODs y LOQs se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6: Límites de detección y cuantificación para ambos métodos. En negrita se indican los valores de LOD más bajos de cada método.

PAH	EAU		EAM	
	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)
NPH	0,0214	0,0713	0,0473	0,1577
ACE	0,0183	0,0611	0,0017	0,0055
FLU	0,0876	0,2921	0,0082	0,0275
PHE	0,0385	0,1283	0,0137	0,0458
AN	0,0005	0,0017	0,0004	0,0015
FTH	0,0093	0,0310	0,0107	0,0356
PY	0,0242	0,0806	0,0151	0,0502
BAN	0,0039	0,0131	0,0014	0,0045
CHY	0,0038	0,0128	0,0011	0,0038
BEP	0,0043	0,0145	0,0067	0,0225
BBF	0,0117	0,0390	0,0090	0,0299
BKF	0,0006	0,0019	0,0007	0,0024
BAP	0,0026	0,0087	0,0006	0,0020
DBAN	0,0023	0,0076	0,0017	0,0055
BGP	0,0032	0,0108	0,0024	0,0079
IND	0,0035	0,0118	0,0019	0,0064

Como podemos ver en la Tabla 6 los LODs y LOQs para ambos métodos son bajos y muy parecidos. En general, se pueden apreciar LODs ligeramente más bajos en el método EAM. No se ha incluido el Acenafteno (ACT) ya que este PAH no se ha podido determinar porque no presenta propiedades fluorescentes. Para realizar los cálculos de LOD y LOQ se analizaron todos los blancos por duplicado.

3.3 Eficiencia de extracción de los PAHs del material de referencia certificado con ambos métodos.

– Extracción asistida por ultrasonidos

Para determinar las concentraciones de cada PAHs, extraídas mediante el método de extracción por ultrasonidos (EAU), se analizaron tres réplicas con duplicado de lectura cada una. En la Figura 14 se muestra un cromatograma obtenido al analizar una alícuota del CRM.

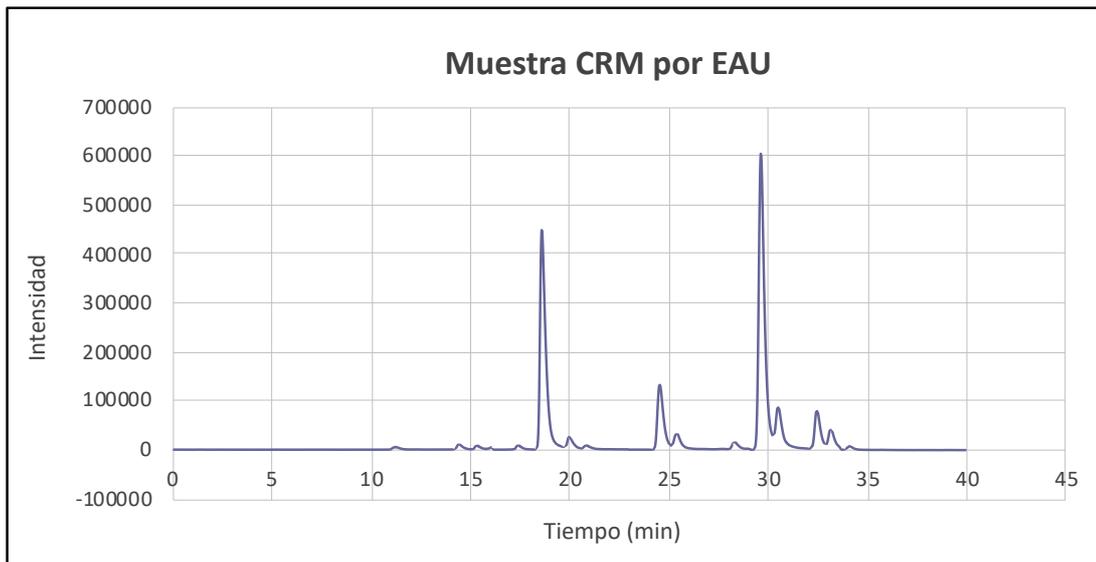


Figura 14: Cromatograma obtenido de extraer por EAU de una muestra CRM.

En la tabla 7 se presentan los porcentajes de recuperación, calculados a partir de la concentración encontrada y la concentración certificada de cada PAHs.

Tabla 7: Porcentaje de recuperación de cada uno de los PAHs para tres réplicas.

PAH	Recuperación (%)		
	alícuota 1	alícuota 2	alícuota 3
NPH	38,3	38,4	40,4
ACE	17,6	18,3	20,6
FLU	36,2	43,6	41,9
PHE	38,9	50,0	42,7
AN	27,3	34,4	32,8
FTH	67,3	78,3	65,5
PY	52,9	49,7	47,3
BAN	56,7	58,6	59,8
CHY	64,2	56,7	61,4
BBF	101,6	110,2	107,6
BKF	76,3	67,8	70,8
BAP	65,5	77,9	-
DBAN	67,7	65,7	60,9
BGP	60,1	65,0	68,9
IND	63,9	75,1	64,8

– Extracción asistida por microondas

Para determinar las concentraciones de cada PAH, extraídas mediante el método de extracción por microondas (EAM), se analizaron tres réplicas con duplicado de lectura cada una. En la Figura 15 se muestra un cromatograma obtenido al analizar una alícuota del CRM.

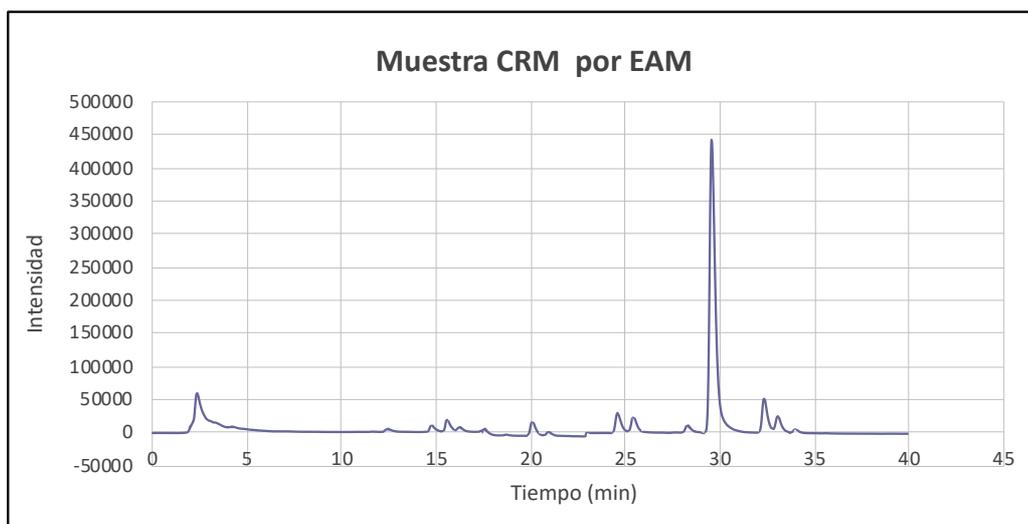


Figura 15: Cromatograma obtenido de extraer por EAM de una muestra CRM.

En la tabla 8 se presentan los porcentajes de recuperación, calculados a partir de la concentración encontrada y la concentración certificada de cada PAH.

Tabla 8: Porcentaje de recuperación de cada uno de los PAHs para tres replicas.

PAH	Recuperación (%)		
	alícuota 1	alícuota 2	alícuota 3
NPH	66,5	73,1	74,6
ACE	77,6	69,2	68,3
FLU	63,9	70,5	59,1
PHE	50,1	56,6	58,7
AN	1,9	2,4	17,3
FTH	107,7	95,2	95,0
PY	62,6	62,9	54,5
BAN	59,9	54,9	38,0
CHY	55,3	53,6	43,7
BBF	100,4	103,7	99,6
BKF	68,1	71,0	65,0
BAP	5,5	12,1	-
DBAN	74,4	77,5	72,4
BGP	45,5	65,7	69,5
IND	63,9	59,4	61,1

A continuación, en la Tabla 9 se presenta la comparación entre las recuperaciones obtenidas por ambas extracciones. la EAU y la EAM, de los PAHs presentes en el material de referencia certificado (CRM) analizado.

Tabla 9: Recuperación (%) de los PAHs por ambos métodos. Los resultados están expresados como la media \pm desviación estándar de réplicas de extracciones (n=3).

PAH	Recuperación (%)	
	EAU	EAM
NPH	39 \pm 12	71 \pm 4
ACE	18,8 \pm 1,6	72 \pm 5
FLU	41 \pm 3	65 \pm 6
PHE	44 \pm 6	55 \pm 4
AN	31 \pm 4	72 \pm 9
FTH	70 \pm 7	99 \pm 7
PY	50 \pm 3	60 \pm 4
BAN	58,2 \pm 1,5	51 \pm 11
CHY	61 \pm 4	51 \pm 6
BBF	106 \pm 4	101 \pm 2
BKF	72 \pm 4	68 \pm 3
BAP	72 \pm 9	9 \pm 4
DBAN	65 \pm 3	75 \pm 2
BGP	60 \pm 4	65 \pm 13
IND	61 \pm 6	61 \pm 2

Se puede observar que, en general, la recuperación de PAHs empleando la EAM es más elevada que la obtenida por EAU, a excepción de AN, BAN, CHY y BBF, los cuales se recuperan mejor por el método de EAU.

Dados los resultados obtenidos, se puede considerar que el Benzo[a]pireno (BAP) no se extrae mediante el método de EAM. Considerando, que la norma UNE-EN se basa en la determinación solo de BAP, es necesario continuar optimizando este nuevo método para alcanzar eficiencias de extracción, al menos como las obtenidas mediante el método EAU.

En la Figura 16, se muestra de una manera más visual, las eficiencias de extracción para cada uno de los PAHs objeto de estudio mediante los dos métodos de extracción utilizados.

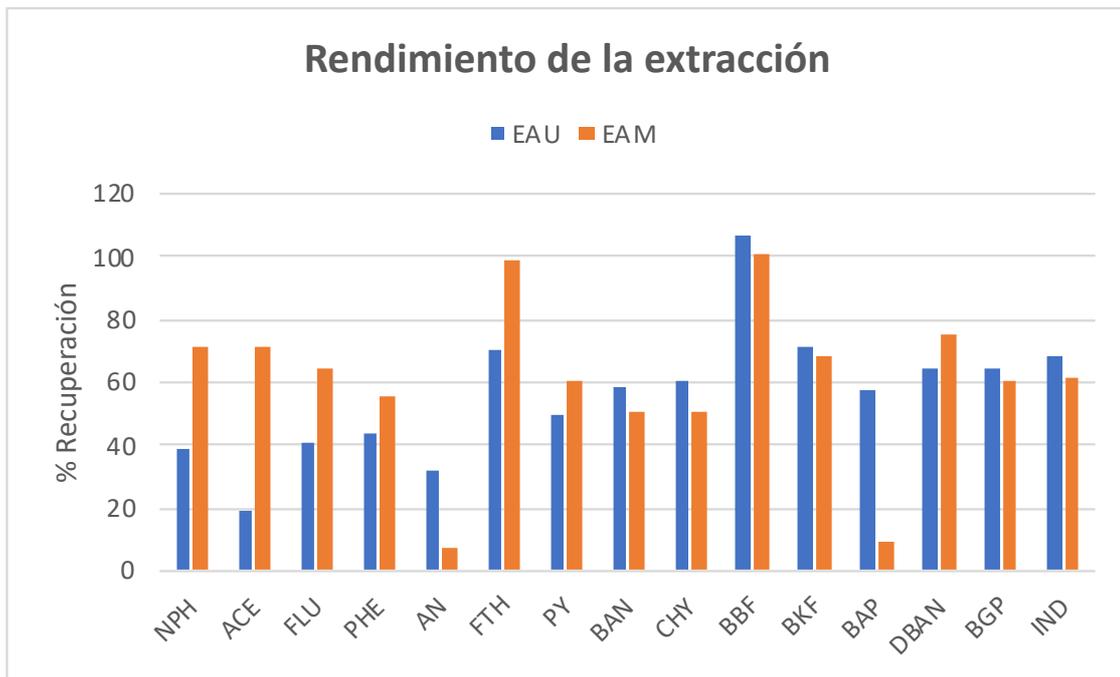


Figura 16: Representación de los rendimientos de extracción.

Podemos ver cómo el rendimiento de la extracción es más alto de manera concluyente para la EAM para siete de los 15 PAHs determinados en la CRM, mientras que para el resto la EAU es ligeramente superior.

Además, el método de EAM utiliza menos volumen de disolventes que el método de EAU, se pasa de utilizar 180 ml de diclorometano/hexano a 30 ml de acetona/hexano, lo que implica una reducción de 6 veces en el volumen de disolventes orgánicos, siendo la EAM un método más amigable con el medio ambiente.

4. Conclusiones

Mediante los ensayos realizados en este TFG se han podido comparar dos protocolos de extracción, por ultrasonidos y por microondas, para 15 PAHs en términos de eficiencias de extracción y límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).

Se han establecido las curvas de calibrado para cada uno de los PAHs, con ajustes satisfactorios en todos los casos, evaluados a partir del coeficiente de correlación lineal ($r > 0,99$).

Los límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ) para cada uno de los PAHs, son, en general, muy semejantes. Sin embargo, se puede apreciar una ligera disminución de los LODs para 12 de los PAHs (y por consiguiente de los LOQs) en el método EAM.

A la hora de establecer las eficiencias de extracción para cada uno de los PAHs, basándonos en los resultados obtenidos, podemos afirmar que el método EAM tiene en general una recuperación mayor que la EAU, a excepción del Antraceno (AN). Los rendimientos de extracción oscilan entre un 19 y un 106% para la EAU y entre un 50 y 101% para EAM. Así, se puede concluir que la EAM es más eficaz de EAU.

Otro aspecto para tener en cuenta es que el proceso de EAM ofrece ventajas en términos de rendimiento y cuidado del medio ambiente, como el ahorro de hasta 6 veces en el volumen de reactivos nocivos para el medio ambiente; además de proporcionar simplicidad operacional y una reducción del tiempo de análisis (de 72 h a 48 h).

En definitiva, se puede concluir afirmando que la EAM es más conveniente con un menor tiempo de análisis, límites de detección más bajos, y reduce la cantidad de disolventes, siendo más amigable con el medio ambiente.

5. Referencias bibliográficas

¹ S.K. Samanta, O.V. Singh and R.K. Jain (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, 20(6), 243-248.

² B. J. Finlayson-Pitts and J. N. Pitts (1997). Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles. *Science*, 276(5315), 1045-1051.

³ L.H. Keith (2015) The Source of U.S. EPA's Sixteen PAH Priority Pollutants, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 35:2-4, 147-160 DOI: 10.1080/10406638.2014.892886

⁴ E. Hussar, S. Richards, Z.Q Lin, R.P. Dixon and K.A. Johnson (2012). Human Health Risk Assessment of 16 Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils of Chattanooga, Tennessee, USA. *Water Air Soil Pollut.* 223(9), 5535–5548.

⁵ EPA United States Environmental Protection Agency (2005). Substance Details - Polycyclic organic matter - 16-PAH. United states: epa.gov. URL: https://iaspub.epa.gov/sor_internet/registry/substreg/substance/details.do?displayPopup=&id=6012

⁶ A. P Khaustov and Z.D. Kenzhin (2019). Problems of polycyclic aromatic hydrocarbons studying in the waters of North-Eastern Caspian Sea. *RUDN Journal Of Ecology And Life Safety*, 27(2), 105-116.

⁷ S.A. Wise, L.C. Sander and M.M. Schantz (2015) Analytical Methods for Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) — A Historical Perspective on the 16 U.S. EPA Priority Pollutant PAHs, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 35:2-4, 187-247.

⁸ M.G. Vivanco, M. Theobald, J.L. Garrido, V. Gil, F. Martín (2018). Evaluación de la calidad del aire en España utilizando modelización combinada con mediciones. preevaluación año 2017. División de Contaminación Atmosférica CIEMAT. URL: https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/preevaluacion2017-ciemat_final_tcm30-482150.pdf

⁹ Directiva 2004/107/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de diciembre de 2004 relativa al arsénico, el cadmio, el mercurio, el níquel y los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el aire ambiente. URL: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:023:0003:0016:ES:PDF>

¹⁰ Norma UNE-EN 15549:2008. Método normalizado para la medición de la concentración de benzo(a)pireno en el aire ambiente (2008) Comité técnico AEN/CTN 77 *Medio ambiente, secretaría AENOR*.

¹¹ J.B. Dallarosa, E.C. Teiseira, M. Pires and J. Fachel (2005). Study of the profile of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particles (PM10) using multivariate methods. *Atmospheric Environment*, 39(35), 6587-6596.

¹² M. Morales (2011). Determinación de Hidrocarburos en muestras de agua por extracción líquido-líquido asistida por ultrasonido. *Universidad de Alicante*. Alicante, España. URL: <https://iuaca.ua.es/es/master-agua/documentos/-gestadm/trabajos-fin-de-master/maria-fernanda-morales.pdf>

¹³ Milestone SrL- Helping Chemists. *New Extraction Application Methods*.

¹⁴ L. A. Currie. Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods including Detection and Quantification Capabilities. IUPAC.(1995) *Pure and Appl. Chem.*, 67, 1699-1723.

6. Anexo

Certificado de análisis del material de referencia certificado (CRM).

Certificate of Analysis

PAHs by HPLC40g

*Certified
Reference
Material*

Product ID SQC017-40G
Lot LRAC2137
Expiration Date February 2023
Manufacturing Date February 2019
Storage Conditions Refrigerate
Solvent/Matrix SOIL

Analyte	Units	Certified ^{1,4} Value	Raw Material Lot	CAS
Naphthalene	µg/Kg	339 ± 6	LRAB7153	91-20-3
Acenaphthene	µg/Kg	311 ± 5	LRAB9330	83-32-9
Acenaphthylene	µg/Kg	559 ± 7	LRAB4214	208-96-8
Anthracene	µg/Kg	609 ± 11	LRAB6310	120-12-7
Benzo(a)anthracene	µg/Kg	278 ± 6	LRAB6500	56-55-3
Benzo(a)pyrene	µg/Kg	345 ± 9	LRAB6333	50-32-8
Benzo(b)fluoranthene	µg/Kg	271 ± 14	LRAB9465	205-99-2
Benzo(g,h,i)perylene	µg/Kg	314 ± 9	LRAB7154	191-24-2
Benzo(k)fluoranthene	µg/Kg	342 ± 10	LRAB4286	207-08-9
Chrysene	µg/Kg	116 ± 5	LRAB6311	218-01-9
Dibenz(a,h) anthracene	µg/Kg	187 ± 5	LRAB4215	53-70-3
Fluoranthene	µg/Kg	361 ± 7	LRAB6312	206-44-0
Fluorene	µg/Kg	401 ± 4	LRAB2524	86-73-7
Indeno(1,2,3-cd) pyrene	µg/Kg	118 ± 5	LRAB9332	193-39-5
Phenanthrene	µg/Kg	654 ± 8	LRAA8780	85-01-8
Pyrene	µg/Kg	316 ± 10	LRAB6501	129-00-00

