



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Contaminantes orgánicos persistentes. Determinación analítica de PCBs en una muestra de mejillones

Iris Morey Serra

Grado de Química

Año académico 2012-13

DNI del alumno: 43220609K

Trabajo tutelado por Rafel Forteza Coll
Departamento de Química Analítica

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

Palabras claves del trabajo:
Bifenilos Policlorados (PCBs), COPs, GC/ECD, GC/MS, Determinación en muestras biológicas

Índice

1.	Breve contextualización histórica	5
2.	Objetivos del proyecto	6
3.	Revisión bibliográfica.....	7
3.1	Principales tipos de <i>COPs</i>	7
3.2	Características generales de los PCBs y las mezclas Aroclor®	8
3.2.1	Solubilidad de los PCBs.....	10
3.2.2	Bioacumulación de los PCBs.....	10
3.2.3	Toxicidad de los PCBs	11
3.3	Tecnologías de destrucción o de reducción de PCBs	12
3.3.1	Oxidación con agua supercrítica (SCWO)	12
3.3.2	Proceso SoLV™	12
3.3.3	Deshalogenación con glicolatos	12
3.3.4	Degradación fotoquímica	13
3.3.5	Degradación bacteriana (“Bioslurry”)	13
3.4	Extracción y determinación de PCBs en muestras biológicas	13
3.4.1	Etapa de aislamiento de los analitos de la matriz	13
3.4.2	Etapa de purificación de los extractos	14
3.4.3	Identificación y cuantificación del contenido de PCBs.....	15
4.	Parte experimental.....	16
4.1	Optimización de las condiciones cromatográficas experimentales	16
4.1.1	Instrumentación y material utilizado	16
4.1.2	Reactivos utilizados durante la fase de optimización de los cromatogramas	17
4.1.3	Optimización de la rampa de temperaturas y caudal del gas portador.....	17
4.2	Obtención de la recta de calibrado	19
4.3	Preparación de blancos de reactivos.....	19
4.3.1	Listado de todo el material necesario	19
4.3.2	Reactivos utilizados	20
4.3.3	Extracción Soxhlet	20
4.3.4	Aplicación del “método del ácido sulfúrico”	20
4.3.5	Segunda etapa de <i>clean-up</i> . Extracción en fase sólida	21
4.3.6	Inyección de las disoluciones resultantes	21
4.4	Tratamiento de las muestras biológicas.....	21

4.4.1	Material utilizado	21
4.4.2	Reactivos necesarios	22
4.4.3	Liofilización	22
4.4.4	Extracción Soxhlet	22
4.4.5	Aplicación del “método del ácido sulfúrico”	23
4.4.6	Segunda etapa de <i>clean-up</i>	23
4.4.7	Inyección de las disoluciones resultantes	23
4.5	Estudio de la recuperación del método	23
4.6	Análisis por espectrometría de masas	24
4.6.1	Instrumentación utilizada.....	24
4.6.2	Metodología	24
4.6.2.1	Cromatogramas en modalidad Scan	24
4.6.2.2	Cromatogramas en modalidad SIM.....	24
5.	Resultados y discusión.....	25
5.1	Rectas de calibrado	25
5.2	Comparación de la resolución de picos del “Método 1” y el “Método 3”	26
5.3	Presentación de los cromatogramas obtenidos.....	26
5.3.1	Comparación entre el cromatograma del blanco y una muestra	26
5.3.2	Comparación entre el cromatograma de un patrón de Aroclor y una muestra	27
5.4	Resultados del estudio de recuperación del método analítico.....	27
5.5	Resultados del análisis por espectrometría de masas	28
6.	Conclusiones.....	31
7.	Bibliografía.....	31

1. Breve contextualización histórica

Bajo el nombre de **compuestos orgánicos persistentes (COPs)** se engloban una serie de compuestos o grupos de compuestos, que tienen en común ser resistentes a la degradación ambiental, tanto por procesos químicos, biológicos como fotolíticos, lo que conlleva a que posean largos tiempos de vida media, además de una gran tendencia a la bioacumulación a lo largo de la cadena trófica. Además, son sustancias tóxicas que pueden causar efectos muy adversos en la salud humana y en el medioambiente.

Algunos de estos compuestos se han producido deliberadamente por la industria química para una amplia variedad de aplicaciones a lo largo de la historia (pesticidas, aditivos retardantes de llama...), mientras que otros se generan de manera no intencionada en algunos procesos de combustión de compuestos orgánicos.

El principal problema es que, debido a que pueden circular globalmente a través de la atmósfera y de los océanos, el uso de los *COPs* no sólo afecta a las zonas donde se vierten estos productos, sino prácticamente a todo el planeta^[1].

Por estas razones, el 17 de mayo de 2004 entró en vigor el **Convenio de Estocolmo**, un acuerdo internacional que actualmente integra a más de 170 países como signatarios y cuyo principal objetivo es la “protección de la salud humana y el medio ambiente frente a los contaminantes orgánicos persistentes”. Inicialmente, se consideraron un total de 12 compuestos y se especificó de forma concreta la acción que debía tomarse con cada uno de ellos^[2]. En 2009, se amplió la lista con 9 *COPs* adicionales^[3].

Dentro de esta clasificación, se encuentran los **bifenilos policlorados (PCBs)**. Los PCBs, ya desde la primera vez que se manufacturaron comercialmente en 1927 acarrearón problemas de salud a los trabajadores de la *Swann Chemical Company*, la cual en 1935 fue comprada por la *Monsanto Chemical Company*, que se convirtió en la principal productora a nivel industrial^[4].

Después de numerosos estudios sobre estos compuestos, en 1966 se advirtió por primera vez a la comunidad científica en general de la potente capacidad de los PCBs de atravesar las porciones lipídicas de las membranas biológicas y de acumularse en los tejidos grasos de los organismos superiores, gracias a una investigación llevada a cabo por el Dr. Jensen^[5]. Sin embargo, fue un accidente que hubo en Japón en 1968, el responsable de poner en estado de alerta a las principales asociaciones ocupadas del medio ambiente. En él enfermaron unas 1300 personas al consumir un aceite de arroz contaminado con fluidos de PCBs^[6]. Desde entonces, se ha intentado controlar su producción y su utilización con un menor o mayor éxito.

2. Objetivos del proyecto

Con el objeto de adquirir las competencias marcadas por el proyecto de fin de grado, se intentará profundizar en el uso de instrumentación habitual en un laboratorio de química, y se tratará de adquirir la desenvoltura y destreza suficientes para poder realizar trabajos tanto de investigación como de cualquier otra índole.

Para ello, en primer lugar se realizará una búsqueda de bibliografía reciente, etapa previa para llevar a cabo cualquier estudio de un problema químico, con el fin de profundizar en el estado actual del tema, lo que permitirá, por una parte, contar con más elementos de discusión y entender los motivos por los que los PCBs se consideran a día de hoy uno de los contaminantes orgánicos más problemáticos a nivel mundial; y por otra, conocer los principales métodos analíticos para la determinación de estos analitos en muestras de interés ambiental.

En segundo lugar, se llevará a cabo el análisis de PCBs en una muestra biológica compleja: ello permitirá, aunque sea de manera muy simplificada por razones obvias de limitación de la extensión del trabajo de fin de grado, experimentar y conocer las diversas etapas del proceso analítico, desde la definición del problema hasta la valoración de los resultados, haciendo más hincapié en las etapas que requieren trabajo experimental. En concreto, para la etapa de adquisición de datos, se pondrán a punto las condiciones experimentales a fin de obtener un método cromatográfico adecuado para conseguir la máxima resolución (y sensibilidad) de los picos presentes en patrones de Aroclor 1262. El sistema que se utilizará será un cromatógrafo de gases de columna capilar acoplado a un detector de captura de electrones (GC/ECD). Se compararán los resultados con los obtenidos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) tanto en su modalidad Scan como con SIM (*Single Ion Monitoring*), con el objeto de sondear las posibilidades de esta técnica en cuanto a la identificación de los analitos y mejora de la selectividad.

Una vez realizados estos estudios, en la etapa de transformación de la muestra (en la que las especies químicas de interés pasan a una forma medible), se realizará en primer lugar la extracción de PCBs de una muestra biológica (especie *Mytilus Chilensis*) mediante un extractor Soxhlet, y a continuación se procederá a la separación de sustancias interferentes y concentración del analito que hagan más sensible y específica la medición de la señal (*clean-up*), a fin de conseguir así una determinación cuantitativa eficaz y fiable.

3. Revisión bibliográfica

3.1 Principales tipos de COPs

Además de algunas características de los COPs mencionadas en el apartado 1 (*Breve contextualización histórica*), también cabe remarcar que suelen ser compuestos **semi-volátiles** (se evaporan con dificultad), muy **estables** (resisten la degradación química biológica y fotolítica), con **baja solubilidad en agua** y con capacidad de **biomagnificarse** a lo largo de la cadena alimenticia, siendo ésta la causa fundamental de la ingestión de estos contaminantes por el ser humano^[7].

En la *Tabla 3.1*, aparecen ordenados los 12 compuestos o familias de compuestos integrantes de la conocida como “la docena sucia”, en función de las medidas que deben tomarse con cada uno según el Convenio de Estocolmo^[2].

Tabla 3.1. Lista de los 12 compuestos orgánicos persistentes iniciales según el Convenio de Estocolmo

COPs cuyo uso y producción debe ELIMINARSE (Anexo A del acuerdo)	
Aldrina	Pesticida para proteger semillas y tierra fértil
Bifenilos policlorados (PCBs)	Fluidos dieléctricos en transformadores y condensadores, fluidos intercambiadores de calor, fluidos hidráulicos, aceites lubricantes, aditivos en: pesticidas, pinturas, adhesivos, selladores, plásticos...
Clordano	Pesticida
Dieldrina	Pesticida
Endrina	Pesticida
Heptacloro	Pesticida
Hexaclorobenceno	Pesticida contra hongos, manufactura de: fuegos artificiales y munición
Mirex	Pesticida
Toxafeno	Pesticida, tratamiento contra la sarna de ganado
COPs cuyo uso y producción debe RESTRINGIRSE (Anexo B del acuerdo)	
Diclorodifeniltricloroetano (DDT)	Insecticida, tratamiento contra la malaria ^(a) y la leishmaniosis
COPs cuya liberación no intencional debe REDUCIRSE (Anexo C del acuerdo)	
Policlorodibenzodioxinas (PCDDs)	Producidas como subproductos en procesos de: combustión (sobre todo en presencia de compuestos clorados), fundido de metales, refinería, manufacturación de productos químicos...
Policlorodibenzofuranos (PCDFs)	Subproductos de incineración de compuestos clorados bajo los 1200 °C

En su cuarta reunión en 2009, la Conferencia de las Partes decidió enmendar los Anexos A, B y C del Convenio mediante la adición de los siguientes productos, es decir, los 9 nuevos COPs^[3]:

Tabla 3.2. Lista de los 9 compuestos orgánicos persistentes nuevos según el Convenio de Estocolmo

COPs cuyo uso y producción debe ELIMINARSE (Anexo A del acuerdo)	
Alfa-hexaclorociclohexano	Insecticida. Producido sobre todo como derivado del lindano
Beta-hexaclorociclohexano	Insecticida. Producido sobre todo como derivado del lindano
Clordecona	Plaguicida agrícola
Hexabromobifenilo	Aditivo retardante de llama
Éter de tetrabromobifenilo	Aditivos retardantes de llama
Éter de pentabromobifenilo	

^(a) La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) prohibió el DDT en 1972, pero en 2006 la Organización Mundial de la Salud (OMS) anunció que el insecticida volvería a ser usado, restringidamente, en su programa para erradicar la malaria.

Éter de hexabromobifenilo Éter de heptabromobifenilo	Aditivos retardantes de llama
Lindano	Insecticida de amplio espectro para el tratamiento de semillas, suelos, árboles y maderas; fármaco para el control de la pediculosis de la cabeza
Pentaclorobenceno	Portador de tintes, fungicida, aditivo retardante de llama, producto químico intermediario para la producción de quintoceno
COPs cuyo uso y producción debe RESTRINGIRSE (Anexo B del acuerdo)	
Sulfonato de perfluorooctano (PFO) Fluoruro de perfluorooctano sulfonilo (PFOS-F)	Componentes de determinados aparatos electrónicos, de espuma extintora, de productos químicos, de fotografía, de líquidos hidráulicos, de textiles...
COPs cuya liberación no intencional debe REDUCIRSE (Anexo C del acuerdo)	
Pentaclorobenceno	(Incluido ya en el Anexo A)

El presente proyecto se centrará en el estudio bibliográfico de algunas propiedades físico-químicas de los PCBs, principalmente las de más interés bajo el punto de vista de contaminante orgánico, así como en su determinación analítica en muestras orgánicas.

3.2 Características generales de los PCBs y las mezclas Aroclor®

Los PCBs son compuestos orgánicos del tipo aromático-clorados que presentan la siguiente fórmula empírica: $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ ($n = 1 - 10$).

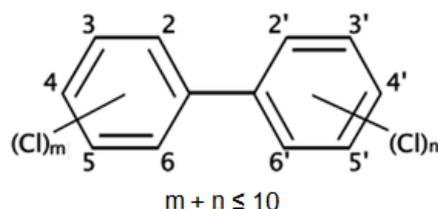


Figura 3.1. Fórmula molecular general de los PCBs

Existen 209 compuestos o congéneres^(b) que presentan esta fórmula. Éstos se pueden dividir en 9 grupos de isómeros, más el decaclorobifenilo^[8]. Se muestra esta información en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Distribución de los PCBs por su nivel de cloración

Grupo de homólogos	Fórmula molecular	Peso molecular	% Cl	Núm. de isómeros
Monoclorobifenilos	$C_{12}H_9Cl$	188.0	19	3
Diclorobifenilos	$C_{12}H_8Cl_2$	122.0	32	12
Triclorobifenilos	$C_{12}H_7Cl_3$	256.0	41	24
Tetraclorobifenilos	$C_{12}H_6Cl_4$	289.9	49	42
Pentaclorobifenilos	$C_{12}H_5Cl_5$	323.9	54	46
Hexaclorobifenilos	$C_{12}H_4Cl_6$	357.8	59	42
Heptaclorobifenilos	$C_{12}H_3Cl_7$	391.8	63	24
Octaclorobifenilos	$C_{12}H_2Cl_8$	425.8	66	12
Nonaclorobifenilos	$C_{12}HCl_9$	459.7	69	3
Decaclorobifenilos	$C_{12}Cl_{10}$	493.7	71	1

^(b) Compuestos químicos con una composición y efectos similares

La **síntesis de PCBs** fue descrita por primera vez en 1881 por Schmidt y Schultz^[9], aunque como ya se comentó en la *Introducción*, fue en 1927 cuando se inició su manufacturación de forma comercial. Ésta, se realizó en forma de mezclas complejas que contenían múltiples isómeros en diferentes grados de cloración, útiles para un amplio rango de aplicaciones ya mencionadas en la *Tabla 3.1*.

El proceso consiste en la cloración directa del compuesto bifenilo con cloro gas a altas temperaturas (170 °C). Es necesaria la presencia de un catalizador, como el cloruro de hierro (II). El producto resultante se purifica para eliminar los restos de catalizador y de ácido clorhídrico (HCl) por tratamiento alcalino seguido de destilación. La duración de todo el proceso determina el grado de cloración de las diferentes mezclas comerciales^[8].

La mayor empresa productora, la *Monsanto Chemical Company*, comercializó estas mezclas bajo el nombre de **Aroclor®**. A cada Aroclor® se le asignan 4 dígitos: los dos primeros indican los 12 carbonos del anillo bifenilo, y los dos últimos indican el porcentaje de cloro presente.

En general, todos los Aroclor® comparten una serie de **propiedades**: se secan con dificultad (aunque cuando forman parte de pinturas no retrasan su velocidad de secado), no se oxidan, no son inflamables ni se descomponen por la acción del calor, son termoplásticos, se adhieren fuertemente a superficies lisas como el vidrio o el metal, poseen alta resistividad eléctrica; son insolubles en agua (pero solubles en la mayoría de disolventes orgánicos y aceites).

Además, cabe remarcar su elevada estabilidad frente a bases y ácidos: no se ven afectados ni por tratamiento hasta ebullición con hidróxido sódico; ni tampoco por tratamiento prolongado durante 255 horas con ácido sulfúrico concentrado.

En la *Tabla 3.4* se muestran algunos valores de propiedades físicas y químicas de estas mezclas^[10].

Tabla 3.4. Propiedades físicas y químicas de los Aroclor® más comunes

Aroclor®	1242	1248	1254	1260	1262
Nº CAS	53469-21-9	12672-29-6	11097-69-1	11096-82-5	37324-23-5
Color	Casi incoloro	Amarillo claro	Amarillo claro	Amarillo claro	Amarillo claro
Aspecto	Aceitoso	Aceitoso	Aceite viscoso	Resina pegajosa	Resina pegajosa
$\rho^{(*)}$ (g/cm ³) (25 °C)	1.381	1.405	1.495	1.555	1.572
Rango destilación (°C)	325 – 366	340 – 375	365 – 390	380 – 420	395 – 425
Índice de refracción	1.628	1.631	1.640	1.648	1.651
Pto. encendido (°C)	176 – 180	194 – 196	-	-	-
Pto. inflamación (°C)	-	-	-	-	-
Pto. de fluidez (°C)	-19	-7	10	31	35 – 38
v de vaporización ^(*) (g/cm ² ·h) (100 °C)	0.000338	0.000152	0.000053	0.00009	0.000013
Presión de vapor (mmHg) (25 °C)	$4.06 \cdot 10^{-4}$	$3.70 \cdot 10^{-5}$	$7.71 \cdot 10^{-5}$	$4.05 \cdot 10^{-5}$	Desconocido
Constante dieléctrica relativa: ϵ_r (25 °C)	5.8	5.6	5.0	4.3	-
Solubilidad en agua (mg/L) (25 °C)	0.24	0.052	0.057	0.08	0.052

^(*) ρ : densidad. v: velocidad

A pesar de que existen 209 congéneres posibles de PCBs, en realidad sólo alrededor de 130 han sido identificados en las mezclas comerciales de Aroclor en concentraciones mayores del 0.05 %^[11].

3.2.1 Solubilidad de los PCBs

Una de las propiedades físico-químicas más características de los PCBs es que son muy poco solubles o insolubles en agua, pero solubles en disolventes no polares, ya que son hidrofóbicos. Además, la solubilidad en agua decrece en general cuando se incrementa el grado de cloración^[8]. Esta propiedad hace que los PCBs reaccionen con los lípidos de los organismos vivos y se acumulen en sus tejidos. Algunos estudios demuestran que, mientras que las concentraciones de PCBs en suero plasmático para un mismo sujeto son inferiores a los 20 ppb, en el tejido adiposo rondan los 2 ppm^[12].

3.2.2 Bioacumulación de los PCBs

La **bioacumulación** se refiere a un proceso en el cual la concentración de una sustancia química alcanza un nivel que supera su misma concentración en el medio respiratorio (por ejemplo: el agua para los organismos acuáticos, o el aire para los mamíferos), en la dieta, o en ambos. El grado de bioacumulación de un compuesto puede expresarse mediante diferentes magnitudes: el factor de bioconcentración (BCF), el factor de bioacumulación (BAF), el factor de biomagnificación (BMF), entre otros^[13]. Según el Convenio de Estocolmo, para que se considere a una sustancia bioacumulable, debe probarse que su BCF o BAF son superiores a 5000, o bien, que el resultado del logaritmo del coeficiente de partición octanol – agua ($\log K_{OW}$) sea superior a 5^[2].

En la *Tabla 3.5* se muestran una serie de valores de $\log K_{OW}$ para algunos congéneres de PCBs^[14]:

Tabla 3.5. Coeficientes de partición octanol/agua de algunos PCBs

Congéneres	Nombre IUPAC ^(*)	$\log K_{OW}$
1	2-ClBf	4.30
9	2,5-DiClBf	5.10
29	2,4,5-TriClBf	5.60
61	2,3,4,5-TetraClBf	5.91
116	2,3,4,5,6-PentaClBf	6.30
136	2,2',3,3',6,6'-HexaClBf	6.70
202	2,2',3,3',5,5',6,6'-OctaClBf	7.10
208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'-NonaClBf	8.16

^(*)ClBf = Clorobifenilo

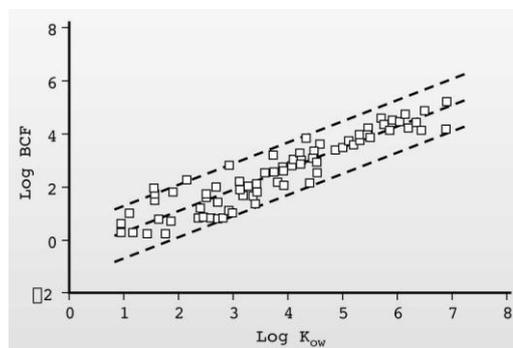


Figura 3.2. Correlación entre el BCF y el K_{OW} en peces^[15]

La *Tabla 3.5* explica desde otro punto de vista lo mencionado en el apartado 3.2.1: los PCBs son más solubles en medios lipídicos que en el agua. Sin embargo, no existe una relación lineal entre el factor lipofílico y la bioacumulación, ya que aquellas moléculas con una disposición más planar son absorbidas más fuertemente que aquellas con los dos anillos aromáticos fuera del plano.

El BCF medio de los PCBs es de unos 100.000^[15]. Se suele tomar como referencia el tejido graso de peces o, sobre todo, de mejillones, ya que tienen una movilidad mínima, filtran una gran cantidad de agua y tienen un sistema enzimático con una capacidad mínima de metabolizar los contaminantes^[16].

El **metabolismo** de cada organismo es también otro factor que puede conducir a una mayor bioacumulación. En el caso de los humanos, los PCBs se absorben muy rápidamente, pero se metabolizan y excretan a una velocidad muy reducida, a través de la orina y la bilis. El hígado es capaz de metabolizarlos vía hidroxilación y conjugación con ácido glucurónico y determinados sulfatos. Los isómeros menos clorados suelen metabolizarse más rápido; de manera que los congéneres de mayor peso molecular tienden a acumularse durante periodos más largos de tiempo. Además, debido a que la velocidad de excreción de PCBs ocurre tan lentamente, la bioacumulación tiene lugar incluso cuando los niveles de exposición a PCBs son muy bajos.

3.2.3 Toxicidad de los PCBs

La toxicidad de los PCBs está muy relacionada con sus propiedades físico-químicas y con su estereoquímica. Los estudios realizados hasta el momento se centran en las evidencias de que los PCBs coplanares, es decir, los que no están sustituidos en *orto*, se asemejan a la molécula 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) en cuanto a su modo de acción y toxicidad, por lo que este total de 12 PCBs coplanares también suele denominarse “*dioxin-like PCBs*”.

Estos compuestos suelen poseer la mayor potencia de entre todos los congéneres para producir la inducción de enzimas oxidasas dependientes del citocromo P450; y, en consecuencia, numerosos efectos adversos. La explicación radica en el hecho de que los PCBs coplanares, al no tener sustituyentes de cloro en la posición *orto*, tienen una mayor rotación libre a lo largo del eje central fenilo – fenilo y así pueden adquirir con mayor facilidad una configuración que les permita interactuar con el centro activo de los enzimas. Por ello, la introducción de 1 ó 2 átomos de cloro en posición *orto* disminuye, pero no elimina necesariamente, ciertas actividades bioquímicas de los compuestos coplanares. Así, está demostrado que los 8 congéneres *mono-orto* y algunos de los *di-orto* congéneres también pueden considerarse semejantes al TCDD^[16,17].

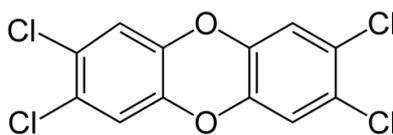


Figura 3.3. Estructura del 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD)

Además de esta serie de efectos bioquímicos, los PCBs también pueden producir un gran número de **efectos a nivel metabólico**. Sin embargo, es difícil confirmar con total seguridad que los PCBs sean la causa directa de todos ellos. Algunos ejemplos son los siguientes^[12]:

- Efectos dermatológicos: cloracné (quistes de queratina), pigmentación oscura de la piel.
- Efectos sobre la función reproductora y en el desarrollo: alteraciones del ciclo menstrual, reducción de la fertilidad, déficits en el desarrollo fetal.
- Efectos endocrinos: disrupción de la acción de las hormonas tiroideas y estrógenas.
- Efectos hepáticos: inducción enzimática microsomal de las células que forman el tejido del hígado.
- Carcinogenicidad: incremento de la incidencia de melanomas, y de cáncer de hígado, de vejiga, etc.

3.3 Tecnologías de destrucción o de reducción de PCBs

En el pasado, los COPs solían almacenarse en vertederos, o quemarse en sistemas de combustión. Sin embargo, ambas opciones presentaban una serie de inconvenientes:

a) Incineración. A pesar de que el comportamiento térmico de los PCBs no varía hasta aproximadamente los 170 °C, a partir de los 300 °C es favorable una ciclación intramolecular con pérdida de hidrógeno, transformándose en policlorodibenzofuranos (PCDFs) y policlorodibenzodioxinas (PCDDs), productos aun más tóxicos^[18,19].

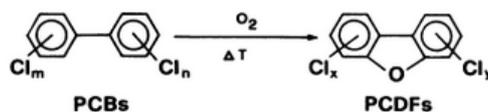


Figura 3.4. Esquema de la transformación de PCBs en PCDFs

Por ello, la legislación actual requiere que los PCBs se quemen a temperaturas superiores a 1200 °C, durante al menos dos segundos en presencia de *fuel-oil*, y en un ambiente con exceso de oxígeno^[20], ya que así se forman principalmente productos inocuos (dióxido de carbono y cloruro de hidrógeno).

b) Entierro en vertederos. Determinados estudios demuestran que los PCBs pueden “escapar” con facilidad de estos lugares de almacenamiento, debido a que se evaporan más rápido a medida que aumenta la humedad de la tierra y los sedimentos^[21].

En los siguientes apartados, se expondrán algunas de las técnicas más innovadoras para la destrucción de PCBs puros, y para la descontaminación de suelos y líquidos.

3.3.1 Oxidación con agua supercrítica (SCWO)

Se aprovecha la capacidad de solubilización de compuestos orgánicos por agua supercrítica y se consigue, mediante la adición de un oxidante determinado (*p.ej.* peróxido de hidrógeno), transformar el hidrógeno en agua, los átomos de cloro en iones cloruro, el carbono en dióxido de carbono, etc.^[22]

3.3.2 Proceso SolV™

El proceso consiste en introducir un metal alcalino (por ejemplo: sodio) en amoníaco anhidro, liberándose electrones a medida que el metal se va disolviendo. Así, los compuestos halogenados, por su alta electronegatividad, cuando se mezclan con la anterior disolución, se neutralizan de manera casi instantánea, formando cloruro de sodio, totalmente inocuo^[21].

3.3.3 Deshalogenación con glicolatos

Para llevarla a cabo se necesita un reactivo llamado APEG, formado por dos componentes: un hidróxido de metales alcalinos (A), y polietilenglicol (PEG). Al mezclar y calentar la tierra contaminada con el APEG, el componente A reacciona con el grupo cloro de la molécula de PCB, formando una sal que no es tóxica, y el PEG ocupa el lugar que antes ocupaba el cloro, volviéndolo menos peligroso^[23].

3.3.4 Degradación fotoquímica

Las longitudes de onda cortas del espectro de la luz solar (295 – 400 nm) son capaces de generar procesos fotolíticos directos e indirectos que pueden degradar pesticidas y PCBs. Para poder aprovechar eficientemente la luz solar es necesario concentrarla para alcanzar las temperaturas suficientes para descomponer o destruir los contaminantes. Con este fin, se utilizan espejos (heliostatos), en los que la radiación solar es reflejada y posteriormente absorbida por un detector adecuado, llegando a alcanzar temperaturas cercanas a los 2300 K.

3.3.5 Degradación bacteriana (“Bioslurry”)

Los suelos contaminados se mezclan con agua para permitir el contacto entre los microorganismos y los contaminantes. Después, esta mezcla (llamada “*slurry*”) es introducida en un biorreactor al que se le suplen cantidades controladas de aire, y en el cual se optimizan al máximo las condiciones de temperatura, concentración de nutrientes y velocidad de aeración durante unos 11 meses^[21].

3.4 Extracción y determinación de PCBs en muestras biológicas

En la actualidad, es posible encontrar numerosos artículos que describen los procedimientos de preparación de las muestras biológicas para determinar PCBs y otros pesticidas organoclorados (OCPs), como el toxafeno, clordano, heptacloro... Tanto PCBs como OCPs pueden considerarse simultáneamente en esta discusión porque se extraen y se analizan de forma conjunta en la mayoría de casos^[24]. Así, la metodología para determinar PCBs y OCPs suele seguir un mismo esquema de análisis: a) el aislamiento de los analitos de la matriz y su posterior concentración en el disolvente, b) la purificación de los extractos y c) la determinación analítica.

No obstante, cabe realizar un pequeño inciso: los PCBs coplanares deberían considerarse por separado porque su metodología analítica suele ser bastante diferente a la que se utiliza para la determinación de PCBs orto-sustituidos y de OCPs. De hecho, la técnica instrumental recomendada para el análisis de éstos dos últimos grupos es la cromatografía de gases acoplada a un detector de captura electrónica (GC/ECD); mientras que no ha resultado ser tan selectiva para el análisis de PCBs coplanares^[25]. Sin embargo, en una mezcla de PCBs, el conjunto de los 12 coplanares suele representar menos del 5% del total, por lo que en este proyecto no se realizará ninguna distinción entre unos y otros, y únicamente se estudiarán las técnicas más generales.

Los organismos que más se utilizan como indicadores para detectar la presencia de PCBs en una determinada región son los **mitílicos** (mejillones), ya que son animales filtradores que viven fijados al sustrato, aunque también puede ser útil el tejido de peces y cetáceos superiores^[16].

3.4.1 Etapa de aislamiento de los analitos de la matriz

Algunas de las principales técnicas para extraer los PCBs de las muestras son: extracciones líquido – líquido (LLE)^[26], **extracción Soxhlet**, extracción por ultrasonificación (USE)^[27], extracción con fluidos supercríticos (SFE), extracción acelerada por microondas (MAE), entre otras.

Las LLE prácticamente ya no se utilizan, puesto que requieren mucho tiempo y cantidad de disolvente, pueden formarse emulsiones y además, se necesita una gran cantidad de matriz analítica, lo cual, especialmente en el caso de muestras ambientales, no siempre es posible^[28]. Por ello, la extracción Soxhlet se propuso como una de las primeras técnicas alternativas a las LLE: no necesita filtración, la temperatura de extracción es superior a la temperatura ambiente y la muestra entra en contacto con el disolvente de manera repetida. Sin embargo, sigue requiriendo grandes cantidades de disolvente (**hexano**, o hexano/acetona 1:1, v:v)^[29], el cual debe ser evaporado previamente a la determinación para concentrar los PCBs, y además suelen necesitarse entre 8 – 24 horas para asegurar un máximo rendimiento^[30,31].

La “clave” principal para la reducción de los tiempos de extracción y del consumo de disolvente la ofrecen técnicas como la MAE y la SFE, porque posibilitan trabajar a altas temperaturas por encima del punto de ebullición del disolvente. De esta manera, se facilita mucho el proceso de extracción porque se incrementa la desorción del analito y su difusión desde la matriz sólida. Estas dos técnicas se han aplicado en el análisis de PCBs en una gran variedad de alimentos, como por ejemplo en: semillas de sésamo^[32], aceite de hígado de bacalao y piensos^[33], carne de cerdo y de pollo^[34], verduras frescas^[35]...

En concreto, para el caso de muestras de tejido de peces o de **mejillones**, las técnicas más utilizadas son la extracción Soxhlet y, de nuevo, la SFE. Ésta última ha resultado ser una alternativa muy atractiva frente al Soxhlet ya que se usan cantidades mínimas de un fluido supercrítico que muchas veces permite que los extractos se analicen sin posteriores etapas de purificación^[36]. El dióxido de carbono es el ejemplo de fluido supercrítico más utilizado, debido a que no es tóxico ni contaminante.

No obstante, a pesar del gran número de ventajas que ofrecen la MAE y la SFE, en el presente proyecto se utilizará la extracción Soxhlet como metodología principal, debido a la disponibilidad de equipos en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la UIB y por la facilidad de uso.

3.4.2 Etapa de purificación de los extractos

Durante el proceso de aislamiento de los analitos de las muestras biológicas, pueden coextraerse diferentes tipos de interferentes, principalmente: grasas, carbohidratos, agua y clorofila. Por tanto, frecuentemente, suele necesitarse una etapa analítica adicional: la purificación de los extractos. La saponificación, la cromatografía de permeabilidad en gel (GPC), el **tratamiento con ácido sulfúrico**, la **cromatografía de adsorción** (en cartuchos de alúmina, sílica-gel o *Florisil*) son algunos de los ejemplos que pueden encontrarse en la bibliografía.

En cualquier caso, en primer lugar suele recomendarse un paso previo de eliminación del agua de las muestras para no perjudicar la eficiencia del proceso de extracción, en el que se utiliza un disolvente apolar. La **liofilización** es la técnica con un mayor número de ventajas frente a otros métodos tradicionales como la mezcla del sustrato con sulfato de sodio (ya que puede generar calor) o el uso de tierras de diatomeas (elimina el problema de la generación de calor, pero puede incrementar significativamente el volumen de la muestra)^[37].

Así, después de la liofilización de las muestras y de la extracción de los analitos de interés, suele aplicarse alguna o varias de las técnicas mencionadas en el primer párrafo de este apartado. La saponificación o la digestión ácida es un método destructivo indicado para la eliminación de lípidos, por ejemplo por tratamiento con ácido sulfúrico después de emplear la técnica USE^[38], o la extracción Soxhlet^[39]. También se han utilizado con este fin columnas de silica-gel impregnadas de ácido sulfúrico^[40]. Sin embargo, el método de purificación más común es la cromatografía de adsorción aplicando la técnica de extracción en fase sólida (SPE)^[41], con la que se han obtenido exitosos resultados durante el análisis de contaminantes de un gran número de muestras de alimentos, incluyendo: PCBs en pescado^[42], OCPs en semillas de sésamo^[43], etc.

La cromatografía de permeabilidad en gel (GPC) se suele recomendar para purificar extractos obtenidos de muestras biológicas; se puede utilizar para separar moléculas grandes, como los lípidos, debido a que su fundamento de operación está basado en la exclusión por tamaño. Por ello, se ha utilizado para purificar una gran variedad de muestras ricas en grasas, como: extractos de aguacate^[44], aceite de oliva^[45], carne de cordero y de cerdo^[46], etc. pero su mayor desventaja es que requiere instrumentación especializada que permita el avance de un caudal forzado de líquido.

Para el caso concreto de muestras de mejillones, la combinación del tratamiento con ácido sulfúrico y la cromatografía de adsorción es la opción elegida por la mayoría de autores^[28]. En el caso de este trabajo, también se utilizarán estas dos técnicas de manera consecutiva.

3.4.3 Identificación y cuantificación del contenido de PCBs

La técnica instrumental utilizada por excelencia en este contexto desde 1960 se trata de la cromatografía de gases acoplada a un detector de captura de electrones (GC/ECD)^[47,48,49], ya que es muy selectivo y sensible a la presencia de moléculas con grupos electronegativos como halógenos, peróxidos y grupos nitro. El nitrógeno se suele usar como gas auxiliar debido a su baja energía de excitación.

Otra de las técnicas ampliamente utilizada en la determinación de PCBs es la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, tanto en su modalidad de barrido (*Scan*) u obtención de espectros completos como la de monitorización de iones individuales (SIM). Con esta modalidad se consigue un nivel de selectividad y sensibilidad comparable a los obtenidos con la técnica GC/ECD.

De manera muy minoritaria se ha empleado la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con este fin^[50], aunque también cabe mencionarla como opción.

Cabe recordar que además de PCBs, el método de análisis utilizado también podría incluir OCPs, puesto que éstos serían también extraídos y posteriormente analizados^[24].

4. Parte experimental

4.1 Optimización de las condiciones cromatográficas experimentales

4.1.1 Instrumentación y material utilizado

· El **cromatógrafo** elegido para la realización de todo el proyecto fue el modelo 7890A, de la casa Agilent, configurado para utilizar tanto columnas capilares como semicapilares, ubicado en el Laboratorio de Cromatografía B11 del edificio de “Serveis Cientifictècnics” de la UIB. El GC/7890A (Figura 4.1) consta de los siguientes elementos:

- Un muestreador automático (*Agilent 7693A Automatic Liquid Sampler*).
- Un detector de ionización de llama (FID).
- Un detector de captura electrónica (ECD) que dispone de un emisor β radiactivo Ni^{63} .



Figura 4.1. Fotografía del GC Agilent 7890A utilizado^[51]

· La **columna cromatográfica** utilizada fue una columna capilar (tubular abierta) de sílice fundida (VARIAN CP8944), con las paredes impregnadas de fase estacionaria formando una película líquida (WCOT). Su longitud es de 30 m; la fase estacionaria es 5%-fenil-95%-metil silicona enlazada químicamente; el grosor de la fase estacionaria, de 0,25 μm ; el diámetro interno, de 0,25 mm; la temperatura máxima de trabajo, de 325 $^{\circ}\text{C}$ (isoterma) o de 350 $^{\circ}\text{C}$ (programada); y el número de platos efectivos por metro, de 4870.

- Micropipetas automáticas de 1 – 10 mL y de 2 – 20 μL (Eppendorf Research[®] Plus)
- Viales de 4 mL pasados por la mufla, y viales adecuados de cromatografía.

Todo el material de vidrio fue limpiado adecuadamente: el material no volumétrico se introdujo durante la noche en un horno tipo mufla a 500 $^{\circ}\text{C}$. El material volumétrico o de gran tamaño, se trató con ácido sulfúrico concentrado y una vez limpio, se lavó con agua corriente y después con agua destilada y acetona de calidad análisis de residuos.

4.1.2 Reactivos utilizados durante la fase de optimización de los cromatogramas

- n-hexano (C₆H₁₄) del 96 % de pureza para análisis de residuos de GC (*Scharlau*), con número de CAS: 110-54-3, peso molecular de 86,18 g/mol, y densidad entre 0,659 – 0,662 g/cm³.
- Disolución “madre” de 10 ng/μL de Aroclor 1262 en hexano, de la casa ALLTECH (CAS: 37324-23-5).
- Disolución diluida de 1 ng/μL de Aroclor 1262 (dilución de la disolución “madre” anterior).
- Disolución “madre” de 0,1 ppm de 12 congéneres de PCBs en heptano de la casa Supelco.
- Disoluciones diluidas de 0,02 ppm y de 0,01 ppm de 12 congéneres de PCBs, preparadas por dilución de la disolución “madre” anterior.

4.1.3 Optimización de la rampa de temperaturas y caudal del gas portador

En primer lugar, se realizaron una serie de inyecciones con aire y n-hexano para **limpiar** la columna de posibles contaminantes, utilizando un método ya creado por otro usuario del cromatógrafo.

Después, se inyectaron diferentes alícuotas de la disolución de 1 ppm de Aroclor 1262, ensayando un total de 3 métodos, cambiando la programación de temperaturas (T), y también variando los caudales. Todos ellos tenían en común el mismo tipo de inyección: en **splitless**, es decir, sin división de la cantidad de muestra, muy adecuado para el análisis de trazas, como ocurre en el presente proyecto. El tiempo de *splitless* seleccionado fue de 1 minuto para todos los métodos^[52,53]

Además, se intentó conseguir en todos ellos el llamado “**efecto disolvente**”, es decir, comenzar con una temperatura inicial lo suficientemente baja, menor que el punto de ebullición del disolvente a fin de que éste se condense en parte, y así los analitos a separar difundan en éste y se concentren al principio de la columna. Suelen aconsejarse temperaturas del horno unos 10 °C inferiores a la temperatura de ebullición del disolvente^[54]; por tanto, en este caso lo idóneo sería una T_{horno} = 60 °C (T_{eb} n-hexano = 69 °C^[55]). Sin embargo, según la bibliografía, es mejor comenzar los cromatogramas con temperaturas entre los 80 – 100 °C, porque si bien la temperatura es más alta de lo que teóricamente debería ser, aún continúa apreciándose el “efecto disolvente” (aunque evidentemente en menor medida), y presenta la ventaja de que se acortan los cromatogramas^[16].

1) La primera prueba fue con el “**Método 1**” (*Tabla 4.1*). El caudal utilizado fue constante (1,5 mL/min); la temperatura de inyección de 280 °C, y la temperatura del detector de 330 °C.

Tabla 4.1. Programación de temperaturas del “Método 1”

MÉTODO 1	Velocidad (°C/min)	T (°C)	Duración (min)	Tiempo cromatograma (min)
Inicial	-	80	1	1
Rampa 1	20	150	0	4,5
Rampa 2	4	280	12	49

2) La segunda fue con el “**Método 2**” (*Tabla 4.2*), basado en la bibliografía^[16]. El caudal utilizado era constante (1,2 mL/min); y las temperaturas de inyección y detección, análogas al “Método 1”.

Tabla 4.2. Programación de temperaturas del “Método 2”

MÉTODO 2	Velocidad (°C/min)	T (°C)	Duración (min)	Tiempo cromatograma (min)
Inicial	-	100	0	0
Rampa 1	20	225	63,75	70

3) Finalmente, en el “Método 3” (Tabla 4.3), en el que la programación de temperaturas se obtuvo como una combinación de los dos anteriores, se decidió incorporar una variación programada del caudal para acortar el tiempo del cromatograma y comprobar si ésta afectaba a la resolución de los picos. En concreto, se impuso un flujo inicial de 1,2 mL/min durante 18 minutos, y un flujo final de 1,5 mL/min (con una rampa de 10 mL/min²).

Tabla 4.3. Programación de temperaturas del “Método 3”

MÉTODO 3	Velocidad (°C/min)	T (°C)	Duración (min)	Tiempo cromatograma (min)
Inicial	-	100	0	0
Rampa 1	20	225	11,75	18
Rampa 2	25	280	19,8	40

Los cromatogramas resultantes al inyectar 1 µL de patrón de 1 ppm de Aroclor 1262 se muestran en la Figura 4.2, aunque el C) no se corresponde exactamente con la misma disolución que el A) y el B), razón por la cual la intensidad de picos del C) es algo mayor.

Como puede observarse, ninguno de los tres consigue una separación de picos perfecta; sin embargo, el “Método 3” es el de menor duración, aunque en él los picos parecen, a simple vista, menos resueltos, mientras que en el método 1 están un poco más separados, pero dura más porque los primeros picos salen más tarde. La posición de los picos del cromatograma B) no difiere prácticamente nada del C), y además es mucho más largo. Por ello, desde ese momento, se decidió inyectar siempre los patrones y las muestras utilizando tanto el “Método 1” como el “Método 3”, puesto que ambos se consideraron adecuados.

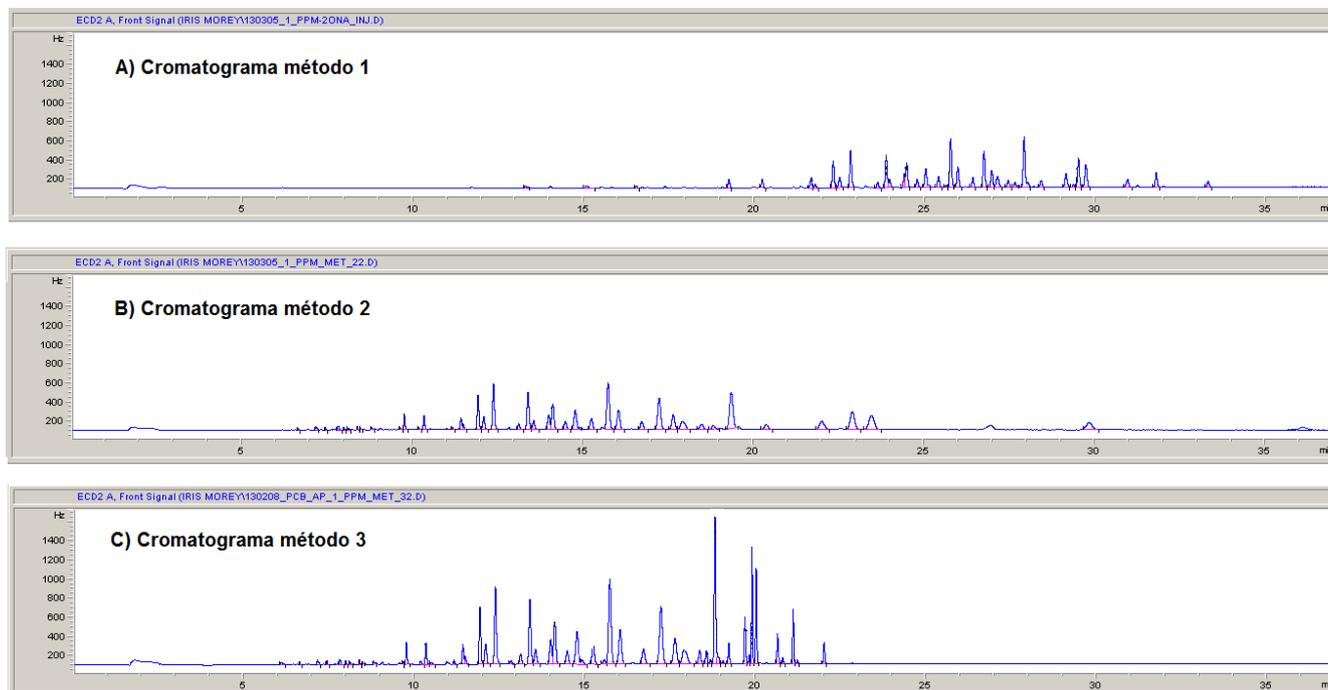


Figura 4.2. Cromatogramas resultantes de los métodos 1, 2 y 3 al inyectar un patrón de 1 ppm de Aroclor 1262

De todas formas, una simple comparación visual no es suficiente para concluir el que un método sea mejor que el otro, por lo que durante la discusión de resultados (apartado 5.2) se analizará su diferente capacidad de separación de picos de manera cuantitativa (cálculo de la resolución).

Para acabar, se inyectó 1 µL de cada una de las disoluciones diluidas de 0,02 ppm de 12 congéneres de PCBs con el fin de comprobar si ambos métodos eran apropiados para lograr la separación de picos también en este caso (*Figura 4.3*).

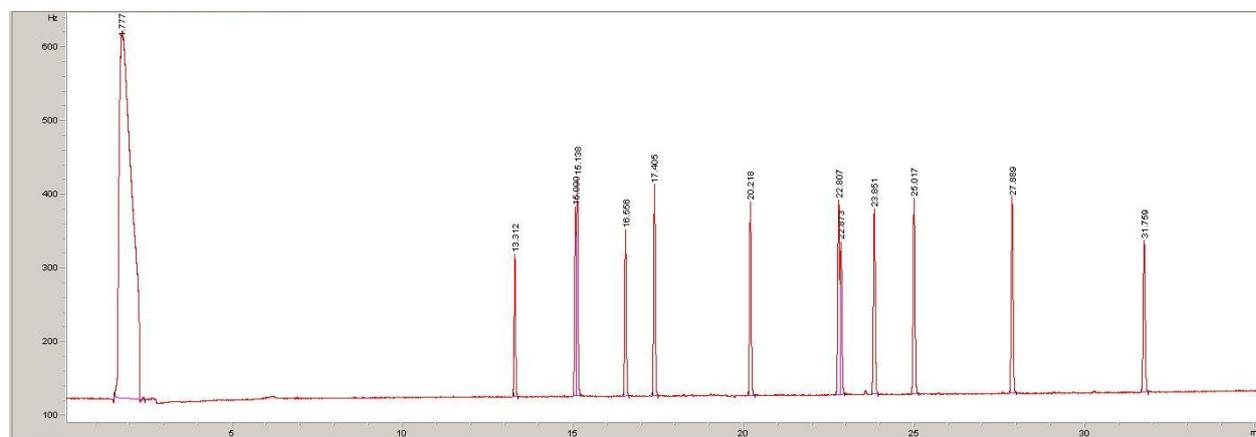


Figura 4.3. Cromatograma del patrón de 12 congéneres de PCBs (0,02 ppm)

4.2 Obtención de la recta de calibrado

Una vez optimizadas las condiciones cromatográficas experimentales, se procedió a la elaboración de los puntos de la recta de calibrado necesaria para interpolar más adelante las muestras de interés. Por dilución del patrón de 10 ppm de Aroclor 1262, se prepararon 7 disoluciones de diferente concentración (0,05 ppm; 0,1 ppm; 0,2 ppm; 0,3 ppm; 0,5 ppm; 0,7 ppm; 1 ppm) y se inyectó 1 µL por duplicado de cada una de ellas utilizando el “Método 1” y el “Método 3”. Se obtuvo así un total de 28 cromatogramas. En las figuras del apartado 5 (*Figura 5.1* y *Figura 5.2*) se representan las rectas de calibrado obtenidas a partir del análisis de regresión (Microsoft Excel).

4.3 Preparación de blancos de reactivos

4.3.1 Listado de todo el material necesario

- 2 matraces esféricos de 100 mL
- 2 placas/mantas calefactoras
- 2 refrigerantes y 2 adaptadores de vidrio
- 2 tubos y 2 cartuchos de extracción Soxhlet
- Tubos de ensayo con rosca de 15 mL
- Columnas de sílice de extracción en fase sólida (SPE): volumen 3 mL y 500 mg de sílice (*Análisis Vínicos S.L.*)
- Material habitual de laboratorio (pipetas pasteur, tubos de ensayo, probeta (100 mL), embudo de vidrio, erlenmeyer, vasos de precipitados, viales de 2 y 4 mL, pinzas, nueces...).
- Rotavapor (*Büchi*)
- Centrifugadora
- Sistema de secado con corriente de N₂
- Sistema de recirculación de agua
- Agitador vórtex
- Micropipetas automáticas

4.3.2 Reactivos utilizados

- n-hexano del 96 % de pureza para análisis de residuos de GC (*Scharlau*), con número de CAS: 110-54-3, peso molecular de 86,18 g/mol, y densidad entre 0,659 – 0,662 g/cm³.

- Ácido sulfúrico concentrado (95 – 98 %), con número de CAS: 7664-93-9, peso molecular de 98,08 g/mol y densidad de 1,840 g/cm³.

4.3.3 Extracción Soxhlet

El primer paso antes de proceder a la extracción de los PCBs de las muestras fue limpiar los cartuchos de extracción de celulosa, los tubos Soxhlet, los matraces y el condensador, de posibles contaminantes. Para ello, se dispuso un montaje como el de la *Figura 4.4* dentro de la campana extractora de gases. Se introdujeron aproximadamente 75 mL de hexano en cada matraz de fondo redondo y se conectaron las placas/mantas calefactoras (95 °C) y el agua de refrigeración.

Este proceso debe llevarse a cabo entre 8 – 24 horas^[30,31]. Por otra parte, se comprobó que con el fin de evitar pérdidas de disolvente era aconsejable el uso de un sistema de recirculación de agua con un sistema de regulación de temperatura fijando ésta entre 10 – 12 °C. De esta manera se consiguió mantener la extracción durante 12 horas, tiempo que posteriormente (al extraer las muestras biológicas), se comprobó que era suficiente al observar que las nuevas porciones de disolvente condensado eran incoloras.



Figura 4.4. Fotografía del montaje de extracción Soxhlet utilizado para los blancos

4.3.4 Aplicación del “método del ácido sulfúrico”

Después de la extracción Soxhlet, se concentraron los extractos de cada matraz esférico con la ayuda de un rotavapor hasta aproximadamente unos 5 mL. Con el objeto de evitar contaminaciones, después de cada uso del rotavapor se sustituía el tubo interior de vidrio por el que refluye el disolvente. Este tubo se limpiaba introduciéndolo en un horno tipo mufla a 500 °C durante la noche.

A continuación, y tratando el extracto de cada matraz esférico por separado, se introdujo éste en tubos de rosca de 15 mL, adicionando algo más de disolvente para asegurar la recogida total de todos los posibles analitos. Después, se añadió 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y se agitó cada tubo con el vórtex durante unos 3 minutos, para favorecer la acción del sulfúrico. Se observó la presencia de una emulsión blanquecina en la parte inferior de los tubos. Se transvasó todo el contenido en tubos de ensayo adecuados para la centrifuga, y se agitó durante unos 2 minutos.

Finalmente, el líquido de la parte superior se concentró con ayuda de una corriente de nitrógeno hasta unos 2 mL, para así poder proceder con la siguiente etapa de *clean-up*.

4.3.5 Segunda etapa de *clean-up*. Extracción en fase sólida



Con el objeto de eliminar posibles impurezas de carácter polar que aún pudieran quedar, se emplearon tubos de extracción en fase sólida (*SPE*), preparados comercialmente, hechos de polipropileno y con adsorbente de sílice ultrapura de 50 μm de tamaño de partícula, de volumen 3 mL y 500 mg de fase estacionaria.

Para llevar a cabo esta etapa de limpieza se siguió el procedimiento habitual, es decir, primero, se acondicionó el cartucho con 1 mL de hexano, y después se vertió la disolución del blanco. Para su elución, se introdujeron unos 4 – 5 mL adicionales de hexano. Además, para favorecer el paso por la columna, se montó un sistema como el mostrado en la *Figura 4.5*, con el que, mediante una bomba de aire, se empujaba continuamente el disolvente hacia el vial de recogida.

El último paso consistió en la evaporación hasta sequedad de todo el disolvente con ayuda de una corriente de nitrógeno, para así conseguir un volumen final exacto por adición de 1 mL de hexano (con la ayuda de una pipeta automática). Para asegurar que todos los analitos quedaran disueltos, se introdujo el vial durante unos segundos en un baño de ultrasonidos.

Figura 4.5. Fotografía del proceso de clean-up y el sistema de bombeo de aire

4.3.6 Inyección de las disoluciones resultantes

Finalmente, se inyectaron las dos disoluciones del blanco en el cromatógrafo de gases, realizando la siguiente secuencia: aire, hexano, blanco 1, blanco 2. Se estudió la posible presencia o no de PCBs y la efectividad de los métodos de *clean-up* seleccionados.

4.4 Tratamiento de las muestras biológicas

4.4.1 Material utilizado

Además del material mencionado en el *apartado 4.3.1*, para el tratamiento de las muestras también se requirieron los siguientes materiales o instrumentos:

- | | | |
|--|------------------|----------------------|
| - Liofilizador (<i>Virtis Advantage</i>) | - Vaso Dewar | - Varillas de vidrio |
| - Placa de Petri | - Espátulas | - Tijeras |
| - Balanza de precisión | - Lana de vidrio | |

4.4.2 Reactivos necesarios

Además de los reactivos mencionados en el apartado 4.3.2, también se requirió el uso de:

- Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) en polvo, extrapuro, con número de CAS: 7757-82-6.
- Agua desionizada.
- Muestras: carne de mejillón (especie *Mytilus Chilensis*), adquirida congelada en un supermercado local.

4.4.3 Liofilización

Para acelerar el proceso de eliminación de agua, se cortaron los mejillones con unas tijeras en pequeñas porciones y se colocaron sobre una placa de Petri. Después, se congelaron con nitrógeno líquido (Figura 4.6), habiéndolos pesado previamente. Inmediatamente después, se introdujeron en el liofilizador, a unos $-50\text{ }^\circ\text{C}$ y al vacío. Al cabo de 24 horas, se analizó la textura y la apariencia de las muestras, y se vio que podían dividirse finamente con facilidad y que parecían completamente secas, por lo que se dio este paso por finalizado y se pesaron de nuevo, observando una pérdida de agua del 72 %.



Figura 4.6. Congelación con nitrógeno líquido

4.4.4 Extracción Soxhlet

Esta fase es prácticamente análoga a la del apartado 4.3.3; sin embargo, para extraer los PCBs de las muestras, éstas tuvieron que introducirse en el interior de los cartuchos de extracción de celulosa, mezcladas homogéneamente con sulfato de sodio anhidro, y colocando lana de vidrio en la parte superior para evitar la salida de las partículas de mejillón durante los ciclos de llenado y vaciado del tubo Soxhlet. La cantidad de muestra liofilizada introducida en cada cartucho fue de aproximadamente 2 gramos, mientras que la cantidad de sulfato de sodio fue 1.5 veces el peso de la muestra.

Una diferencia a destacar respecto a la extracción de los blancos fue la intensa coloración amarilla que adquirieron los extractos, fruto de la gran cantidad de compuestos extraídos con el hexano (Figura 4.7).



Figura 4.7. Coloración amarillenta de la extracción Soxhlet de las muestras

4.4.5 Aplicación del “método del ácido sulfúrico”



En el caso del tratamiento de las muestras, en esta etapa se formaron emulsiones durante la agitación con el vórtex después de la adición del ácido sulfúrico (*Figura 4.8*). Esto es comprensible debido a la complejidad de la matriz orgánica inicial, la cual provoca que muchos otros compuestos pasen de la fase orgánica a la fase acuosa. Mediante la adición de varios mililitros de agua desionizada, fue posible romper la emulsión y continuar con el proceso de centrifugado. Se repitió esta etapa un total de 3 veces con cada muestra, para asegurar un correcto *clean-up* de la misma.

Figura 4.8. Emulsión formada tras la adición de ácido sulfúrico

4.4.6 Segunda etapa de *clean-up*

La única diferencia en el tratamiento de los blancos y de las muestras en esta etapa fue la adición de una cierta cantidad de sulfato sódico sobre el soporte sólido adsorbente de los cartuchos cromatográficos, para eliminar posibles restos de agua al destruir las emulsiones en el paso anterior.

4.4.7 Inyección de las disoluciones resultantes

Finalmente, se inyectaron las dos disoluciones de las muestras en el cromatógrafo de gases, realizando la siguiente secuencia: aire, hexano, blanco 1, blanco 2, muestra 1, muestra 2. Se integraron manualmente todos los cromatogramas y se compararon los picos de las muestras con los blancos y con los patrones para observar la posible coincidencia de determinados picos.

4.5 Estudio de la recuperación del método

Para comprobar si se producen o no pérdidas de los analitos en el conjunto de operaciones llevadas a cabo en el método analítico (extracción, evaporación, limpieza y obtención de la disolución a inyectar) se repitieron dos nuevas determinaciones, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, con la misma cantidad de muestra, pero añadiendo a cada cartucho 1 mL de disolución patrón. De esta manera, y puesto que al final del método analítico la disolución a inyectar tiene de nuevo 1 mL, las áreas de los picos de los cromatogramas deberían ser iguales a las obtenidas al inyectar la misma disolución patrón de Aroclor 1262 (0,5 ppm).

4.6 Análisis por espectrometría de masas

4.6.1 Instrumentación utilizada

· Cromatógrafo de gases Agilent 7890A, combinado con un espectrómetro de masas (Agilent) 5975C con detector de cuadrupolo. La ionización se produjo por impacto de electrones (70 eV) y la calibración se llevó a cabo usando los iones de m/z 69, 219 y 502, correspondientes a la perfluorotributilamina (PFTBA).

· La columna cromatográfica poseía exactamente las mismas características que la descrita en el apartado 4.1.1. Las condiciones cromatográficas también fueron las mismas que en los análisis realizados en el apartado 4.4 en los que se usó el detector de captura de electrones (“Método 3”).

4.6.2 Metodología

A continuación se describirán las experiencias realizadas para comparar los resultados obtenidos mediante el ECD, con los obtenidos con un detector de espectrometría de masas (MSD).

4.6.2.1 Cromatogramas en modalidad Scan

Utilizando las mismas condiciones cromatográficas del “Método 3” (Tabla 4.3), se obtuvieron los cromatogramas de las disoluciones patrón de 0,5 ppm y 10 ppm de Aroclor 1262, y de la muestra 1, usando la modalidad *Scan* en el rango de masas entre m/z 45 y m/z 450 daltons.

4.6.2.2 Cromatogramas en modalidad SIM

El modo SIM consiste en una *monitorización selectiva de iones* característicos de los compuestos presentes en la muestra, con el que se consigue que el detector MSD sea más sensible y selectivo. Es el modo que se utiliza para análisis cuantitativo de trazas de compuestos conocidos.

Puesto que el número de picos presentes en el Aroclor 1262 es muy elevado se optó por seleccionar 2 ó 3 iones característicos de los isómeros con el mismo número de átomos de cloro. En la Tabla 4.4 se muestran dichos iones, así como los tiempos a partir de los cuales van a ser examinados. El criterio seguido para la selección de los iones ha sido el que fueran los más altos (abundantes), aunque si se desea puede optarse por escoger iones más selectivos.

Tabla 4.4. Parámetros del modo SIM seleccionados

Compuestos	m/z característico de los iones elegidos	t_R de comienzo del barrido
Diclorobifenilos	152 y 222	5.0
Triclorobifenilos	186, 221 y 256	5.5
Tetraclorobifenilos	220 y 292	7.5
Pentaclorobifenilos	254 y 326	8.5
Hexaclorobifenilos	290 y 360	10.0
Heptaclorobifenilos	324 y 394	12.4
Octaclorobifenilos	358 y 430	19.1

5. Resultados y discusión

5.1 Rectas de calibrado

En la *Figura 5.1* y *Figura 5.2* se muestran las rectas de calibrado obtenidas en el apartado 4.2. El coeficiente de correlación de ambas rectas es muy elevado, y los valores de la pendiente y de la ordenada en el origen son muy similares tanto para el “Método 1” como para el “Método 3”.

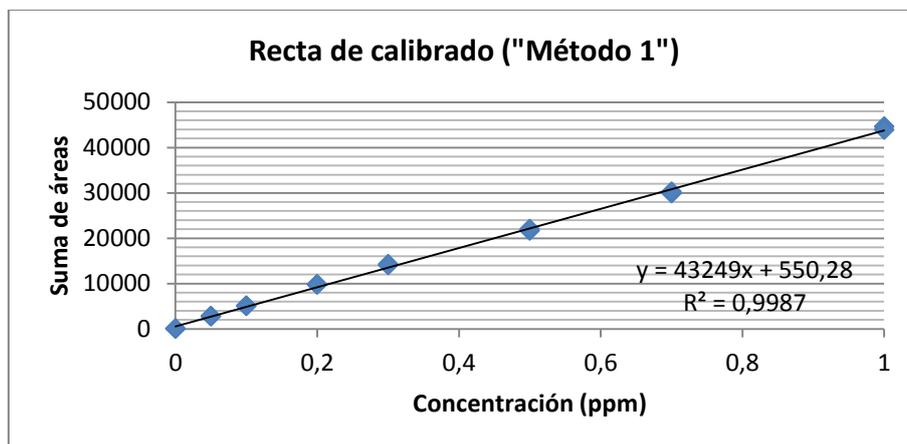


Figura 5.1. Recta de calibrado del “Método 1” cromatográfico (inyecciones 1 y 2)

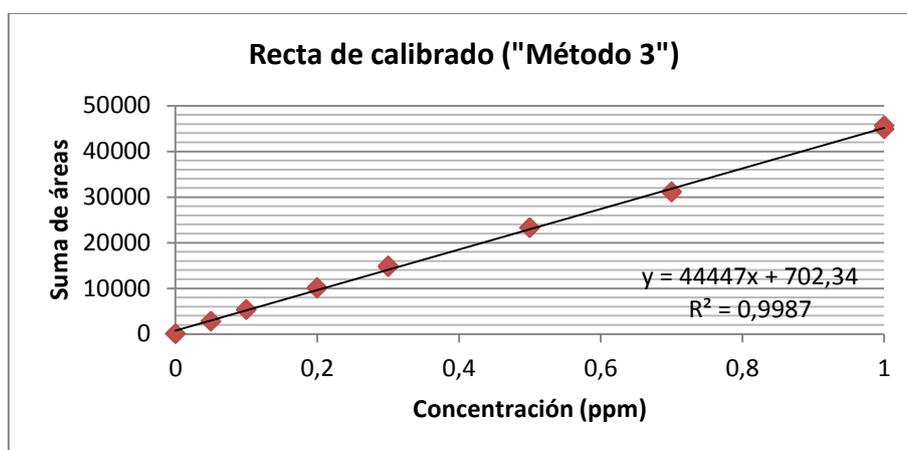


Figura 5.2. Recta de calibrado del “Método 3” cromatográfico (inyecciones 1 y 2)

A partir del “error típico” ($s_{y/x}$) de cada recta, puede estimarse el valor del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) de las determinaciones cromatográficas para cada método usado^[56]:

Tabla 5.1. Límite de detección y límite de cuantificación del GC/7890A

	“Método 1”	“Método 3”
LOD (ppm)	0,04	0,04
LOQ (ppm)	0,12	0,12

$$LOD = \frac{3 \cdot s_{y/x}}{b}$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot s_{y/x}}{b}$$

Figura 5.3. Ecuaciones del LOD y LOQ. “b” es el valor de la pendiente de la recta

5.2 Comparación de la resolución de picos del “Método 1” y el “Método 3”

Para poder comparar la capacidad de separación de picos de los métodos que se han ido utilizando a lo largo del trabajo, decidió calcularse el parámetro de la resolución (R_s) de una serie de picos. Se dice que cuando el valor de R_s es cercano a 1'5, es un buen indicador de que los picos están correctamente separados, mientras que si R_s es cercano a 0'5, ocurre lo contrario^[56]. Según los datos de la *Tabla 5.2*, queda patente que el “Método 3” es el más idóneo en este aspecto.

Tabla 5.2. Resultados de la resolución calculada para tres parejas de picos de los métodos 1 y 3

	“Método 1”	“Método 3”
t'_R de la pareja de picos (1)	23,850 y 23,946	13,417 y 13,581
Resolución (1)	0,83	1,23
t'_R de la pareja de picos (2)	24,384 y 24,452	14,026 y 14,144
Resolución (2)	0,56	0,85
t'_R de la pareja de picos (3)	27,893 y 27,998	18,812 y 18,907
Resolución (3)	0,82	1,17

$$R_s = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{0,5 (W_2 - W_1)}$$

Figura 5.4. Ecuación de la R_s usada.
“ W ” es la amplitud del pico

5.3 Presentación de los cromatogramas obtenidos

5.3.1 Comparación entre el cromatograma del blanco y una muestra

En la *Figura 5.5* se superponen los cromatogramas del blanco y de la muestra. Puede observarse una gran similitud entre ambos cromatogramas (tiempos de retención y áreas similares) lo que lo permite deducir que los picos presentes en la muestra son debidos a contaminantes del blanco de los reactivos.

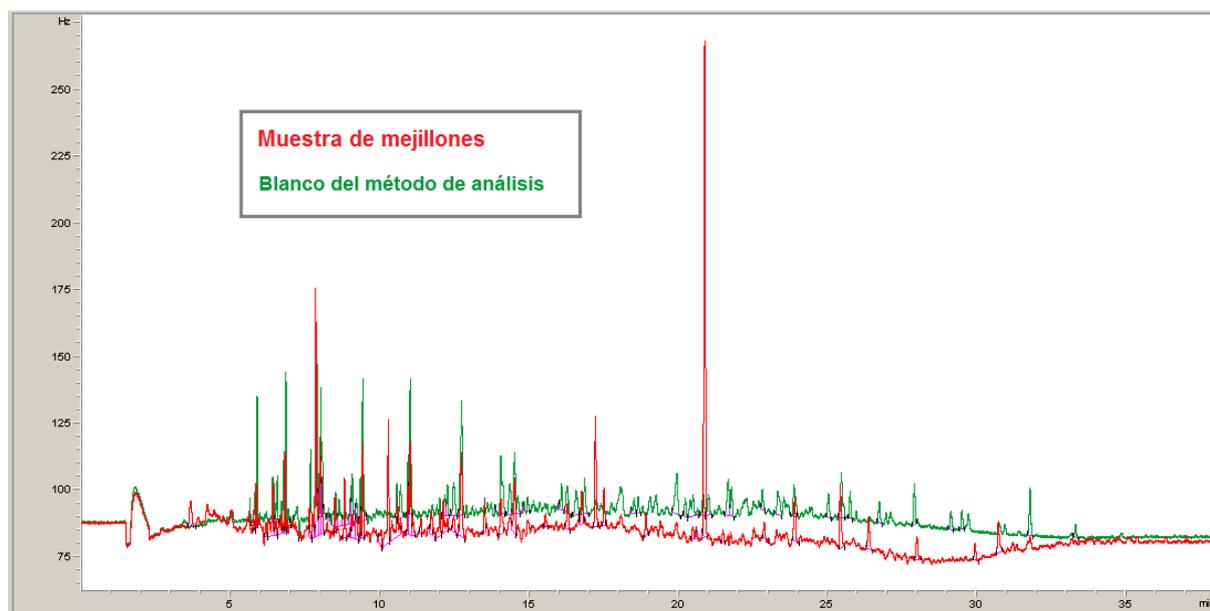


Figura 5.5. Superposición de los cromatogramas del blanco del método de análisis y de una muestra de *Mytilus Chilensis*

5.3.2 Comparación entre el cromatograma de un patrón de Aroclor y una muestra

Al comparar la muestra de mejillones analizada con un patrón de Aroclor de 0,1 ppm, puede verse la gran diferencia entre los dos cromatogramas (*Figura 5.6*). Los pocos picos de la muestra que coinciden con el patrón, ya habían sido descartados previamente por comparación con el blanco.

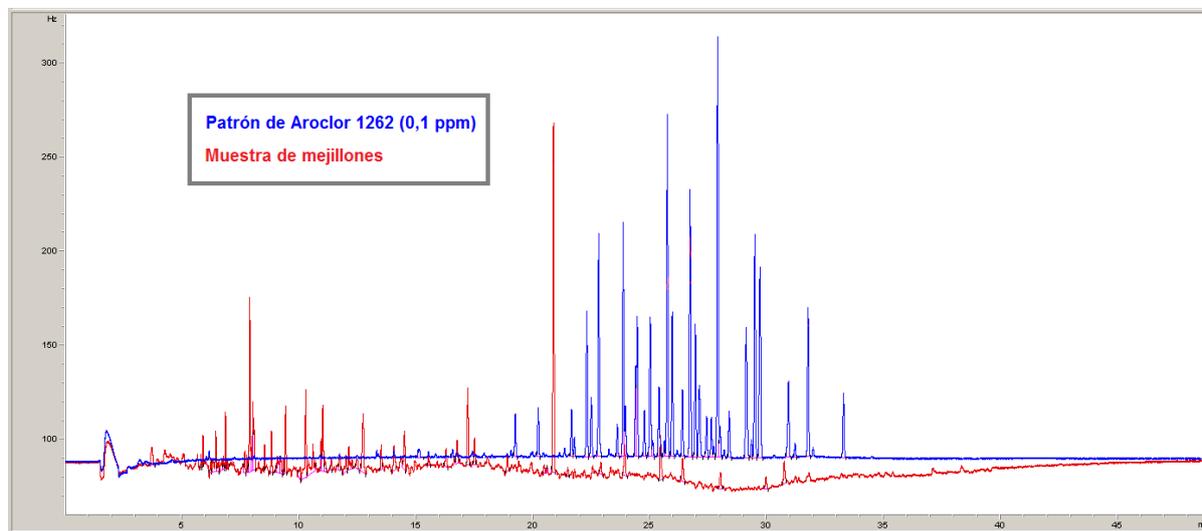


Figura 5.6. Superposición de los cromatogramas de un patrón de Aroclor (0,1 ppm) y de una muestra de *Mytilus Chilensis*

A la vista de estos resultados, podría concluirse que **la muestra biológica analizada no contiene PCBs**, o al menos, que no contiene un contenido de PCBs superior al límite de detección del instrumento; aunque en cualquiera de los dos casos, no supondría un riesgo para la salud humana ya que no superaría el límite de tolerancia máximo establecido para los PCBs en una porción de tejido comestible de pescado (2 mg/Kg), según la *U.S. Food and Drug Administration*^[57].

Esto encaja con algunos datos bibliográficos de muestras de mejillones recolectadas en aguas chilenas, es decir, de las zonas de las que se exporta la mayor parte de la carne de mejillón que puede encontrarse en hipermercados españoles. Por ejemplo, en la bahía del Corral (Chile), los rangos de concentración de PCBs por Kg de mejillón oscilan entre los 0,00017 – 0,00038 mg^[58], mientras que la zona de Punta Arenas es donde se registran los valores más altos de concentración, que aun así, siguen sin ser alarmantes (0,298 mg PCBs/Kg mejillón^[59]). A lo largo de la Costa Atlántica española tampoco se observan valores muy elevados en algunos sedimentos analizados de la bahía de Cádiz, del estuario del río Guadalquivir, etc. (0,05 mg PCBs/Kg sedimento^[60]).

5.4 Resultados del estudio de recuperación del método analítico

Para asegurar que el hecho de no haber detectado PCBs en la muestra de mejillones no se debe a errores experimentales, además de otras razones ya comentadas en el *apartado 4.5*, se han comparado los cromatogramas resultantes de dos muestras dopadas con 1 mL de patrón de Aroclor de 0,5 ppm cada una, y de una inyección de este mismo patrón (*Figura 5.7*). Visualmente, ya puede adelantarse la gran coincidencia en la intensidad de picos de ambos cromatogramas.

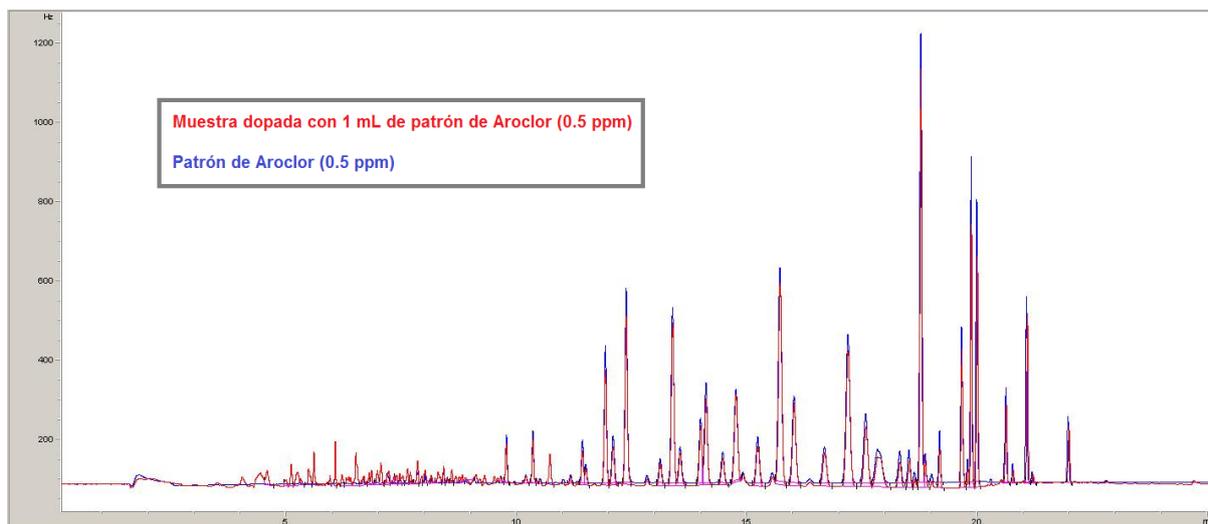


Figura 5.7. Superposición de los cromatogramas de una muestra dopada y de una disolución de Aroclor 1262 de 0.5 ppm

El porcentaje de recuperación del patrón de PCBs (calculado a partir de la relación entre las áreas totales de los picos durante los tiempos de retención indicados en la tabla inferior) se muestra en la Tabla 5.3. No aparecen los datos de la muestra “dopada” 2, ya que se consideró una experiencia nula debido a un error experimental en el que se perdió cierta cantidad de ésta durante el proceso de *clean-up*, pero no pudo repetirse a causa de la limitación de tiempo del trabajo experimental del proyecto de fin de grado.

Tabla 5.3. Porcentaje de recuperación del patrón de Aroclor 1262 (0,5 ppm) utilizando el “Método 1” y el “Método 3”

	“Método 1”	“Método 3”
Rango de t_R (min)	13,3 – 33,3	11,1 – 22,0
Suma de áreas del patrón	35467	31885
Suma de áreas de la muestra “dopada” 1	29990	28354
% de recuperación de la muestra “dopada” 1	85 %	88 %

Debido a que la tasa de recuperación del patrón de Aroclor es muy elevada, se confirma la idea de que el resultado negativo en cuanto a la detección de PCBs en la muestra es válido.

5.5 Resultados del análisis por espectrometría de masas

La Figura 5.8 muestra uno de los cromatogramas obtenidos en modo *Scan* para la disolución de 10 ppm de Aroclor 1262, mientras que en la Figura 5.9 se compara el espectro de masas experimental del pico situado entre los t_R : 11,222 – 11,241 min, con el de la librería de espectros. Estos espectros, junto con los tiempos de retención, permiten garantizar la identificación de algunos congéneres de PCBs mediante búsqueda y comparación en una librería de espectros (NIST *database*).

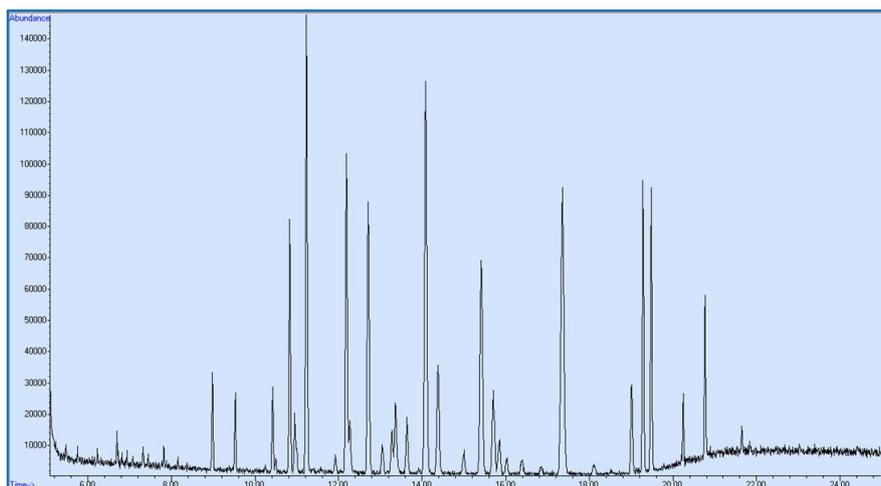


Figura 5.8. Cromatograma del patrón de Aroclor 1262 (10 ppm) obtenido mediante un MSD en modo Scan

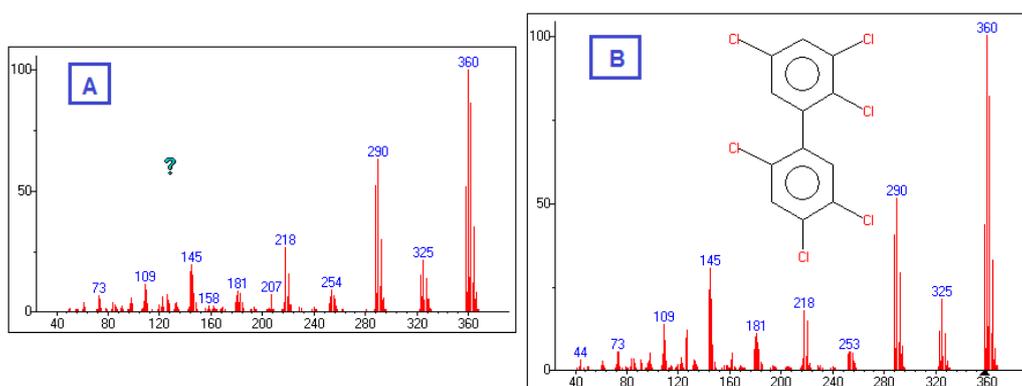


Figura 5.9. Comparación entre el espectro de masas del congénere 149 obtenido experimentalmente (A) y el espectro del mismo congénere encontrado en la biblioteca (B), con un porcentaje de coincidencia del 91,5 %

Al tratar de analizar el espectro de masas de la muestra de mejillones, se observa como su cromatograma se asemeja a una “matriz compleja sin resolver”, una nomenclatura proveniente del anglicismo “unresolved complex matrix (UCM)”. Así, la *Figura 5.10* pone de manifiesto la ganancia de selectividad que supone la utilización de un detector específico para moléculas con grupos electronegativos (ECD), frente al uso de un detector universal como es un espectrómetro de masas.

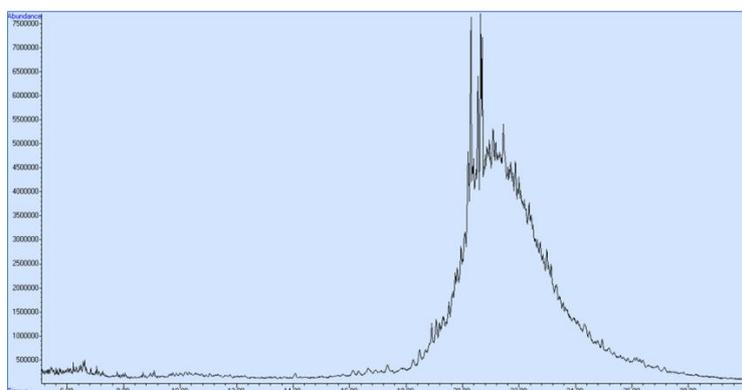


Figura 5.10. Cromatograma de la muestra de *Mytilus Chilensis* obtenido mediante un MSD en modo Scan

Esta escasa selectividad produce el mismo efecto en las disoluciones de patrón inyectadas, de manera que sólo se consigue un cromatograma aceptable a partir de la concentración de 10 ppm. Sin embargo, tras seleccionar una serie de iones determinados (*Tabla 4.4*), es decir, con el modo SIM, se obtiene una importante mejora de la relación señal/ruido, de tal manera que incluso un patrón muy diluido (0,5 ppm) podría servir para la identificación de congéneres concretos de PCBs (*Figura 5.11*).

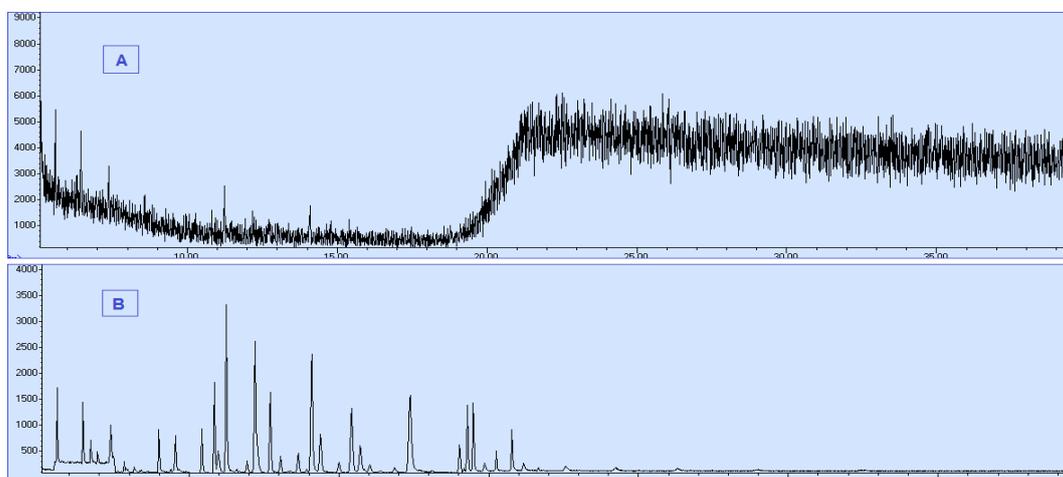


Figura 5.11. Cromatograma de un patrón de Aroclor 1262 (0,5 ppm) obtenido en modo Scan (A) y en modo SIM (B)

Por ello, después de aplicar el modo SIM también al patrón de 10 ppm, se intentaron identificar algunos de los PCBs del Aroclor 1262, por comparación con la disolución de 12 congéneres inyectada en el apartado 4.1.3 y utilizando la librería de espectros. El resultado se muestra en la *Figura 5.12*.

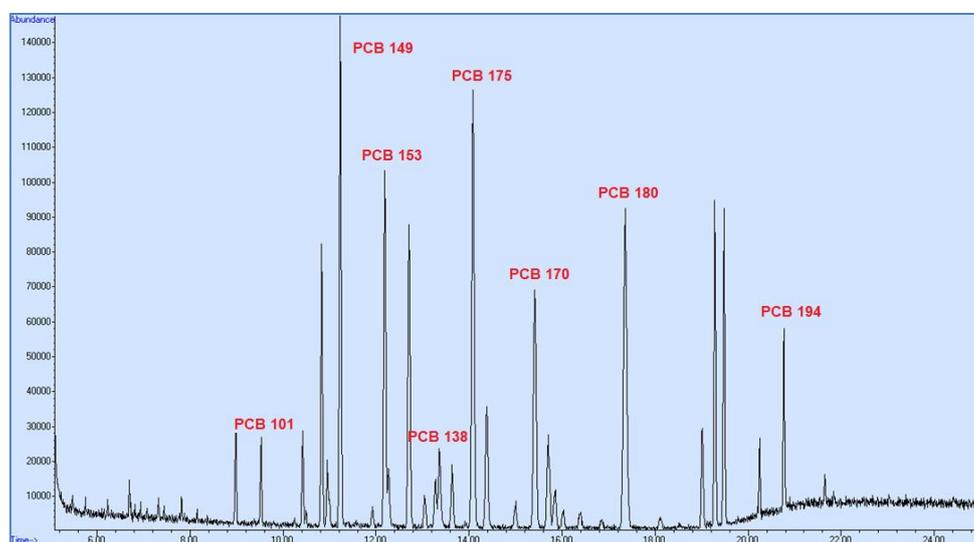


Figura 5.12. Identificación de algunos congéneres de PCBs del patrón de Aroclor 1262 (10 ppm)

Por tanto, a modo de conclusión, podría decirse que, debido a la notable mejoría que proporciona el uso del modo SIM, la espectrometría de masas podría servir como alternativa para la cuantificación del contenido de PCBs de una muestra orgánica, además de que permite la identificación de congéneres individuales por comparación con la librería de espectros.

6. Conclusiones

La determinación analítica de PCBs es una tarea bastante laboriosa, porque generalmente las muestras de estudio poseen unas matrices orgánicas muy complejas que requieren largos procesos de purificación consistentes en múltiples pasos diferentes. Asimismo, la etapa de extracción de los analitos utilizando tubos Soxhlet también precisa de un considerable número de horas para ser llevada a cabo, y además puede llegar a resultar algo cara por la cantidad de disolvente necesario y por el elevado gasto de agua de refrigeración. Sin embargo, son técnicas muy sencillas de aprender para cualquier químico que se encuentre en los inicios de una investigación relacionada con estos temas; y además, no requieren instrumentación demasiado específica, sino equipos de vidrio disponibles en casi cualquier laboratorio, de tal manera que si sumamos a esta lista la gran eficiencia en lo que a la recuperación de PCBs se refiere, puede justificarse la elección de estos métodos y no de otros más modernos.

Después de todo, no se detectaron PCBs en la muestra de mejillones de la especie *Mytilus Chilensis*. Este dato encajaba con los aportados por algunos estudios de la bibliografía, pero para asegurar que durante el proceso experimental se había recuperado la máxima cantidad de PCBs posibles, se doparon las muestras con un volumen perfectamente conocido de patrón de Aroclor 1262, y se calculó el porcentaje de pérdidas que fue de alrededor el 15 %, el cual en su mayor parte puede atribuirse a las dificultades encontradas durante los procesos de *clean-up* de las muestras, por lo que aun así, puede confirmarse la robustez de los métodos seleccionados.

Finalmente, se dedicó una parte del proyecto a la identificación de algunos congéneres concretos del Aroclor 1262 usando como detector un espectrómetro de masas, que al disponer de una amplia librería de espectros, permite realizar esta función de manera eficaz.

7. Bibliografía

- [1] Samara, Fatin. *Persistent Organic Pollutants (POPs) in the Environment and their Endocrine Disrupting Effects on Fish*. Tesis doctoral, Nueva York, **2006**.
- [2] Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). *Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes*, Estocolmo, **2001**.
- [3] Drost, Philip J.J. (ed.). *Multilateral environmental agreements: State of Affairs and Developments*. Eleven International Publishing, The Hague, **2008**.
- [4] Erickson, M.D., Kaley II, R.G. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 18: 135 – 151 (**2011**).
- [5] Jensen, S. *New Sci.*, 32: 612 – 618 (**1966**).
- [6] Kuratsune, M., Nakamura Y., Ikeda M., Hirohata, T. *Chemosphere*, 16: 2085 – 2088 (**1987**).
- [7] Harrad, S. (ed.). *Persistent Organic Pollutants*. John Wiley & Sons, Chichester, **2009**.
- [8] Robertson, L., Hansen, L. (eds.). *PCBs: Recent Advances in Environmental Toxicology and Health Effects*. The University Press of Kentucky, Lexington, **2001**.
- [9] Schmidt, H., Schultz, G. *Ann. Chim.*, 207: 338 – 344 (**1881**).
- [10] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *PCBs: Chemical and Physical Information*, **2004**.
- [11] Giesy, J., Kurunthachalam, K. *Crit. Rev. Toxicol.*, 28(6): 511 – 569 (**1998**).
- [12] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Polychlorinated Biphenyls (PCB) Toxicity*, **2000**.
- [13] Gobas, F., Wolf, W., et al. *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 5(4): 624 – 627 (**2009**).
- [14] Kamlet, M.J. et al. *Environ. Sci. Technol.*, 22(5): 503 – 509 (**1988**).
- [15] Master, G.M., Ela, W. *Introduction to Environmental Engineering and Science*. Prentice Hall, New Jersey, **2008**.

- [16] Canals Salvà, Andreu. *Estudi sobre la determinació de PCBs en mostres d'interès ambiental*. Memòria de llicenciatura, Universitat de les Illes Balears, **1991**.
- [17] Safe, S., Bandiera S., et al. *Environ. Health Perspect*, 60: 47 – 56 (**1985**).
- [18] Weber, R. *Organohalogen Compd.*, 66: 1273 – 1280 (**2004**).
- [19] Hutzinger, O., Choudhry, G.G., Chittim, B.G., Johnston, L.E. *Environ. Health Perspect.*, 60: 3 – 9 (**1985**).
- [20] Environmental Protection Agency (EPA). *Polychlorinated Biphenyl Inspection Manual*. Washington, **2004**.
- [21] Environmental Protection Agency (EPA). *Destruction technologies for polychlorinated biphenyls (PCBs)*. Washington, **2000**.
- [22] Abeln, J., Kluth, M., Petrich, G., Schmieder, H. *High Press. Res.*, 20(1-6): 537 – 547 (**2001**).
- [23] Environmental Protection Agency (EPA). *Guía del ciudadano: La deshalogenación química*. Washington, **1996**.
- [24] Muir, D., Sverko, E. *Anal. Bioanal. Chem.*, 386: 769 – 789 (**2006**).
- [25] Reiner, E.J., Clement, R.E., Okey, A.B., Marvin, C.H. *Anal. Bioanal. Chem.*, 386: 791 – 806 (**2006**).
- [26] Ramos, L., Eljarrat, E., Hernandez, L. M., Rivera, J., Gonzalez, M. J. *Chemosphere*, 38(13): 3141 – 3153 (**1999**).
- [27] Ferrer, I., Garcia-Reyes, J.F., Mezcuca, M., et al. *J. Chromatogr. A*, 1082(1): 81 – 90 (**2005**).
- [28] Beyer, A., Biziuk, M. *Food Chem.*, 108: 669 – 680 (**2008**).
- [29] Fidalgo-Used, N., Centineo, G., Blanco-Gonzalez, E., Sanz-Medel, A. *J. Chromatogr. A*, 1017(1): 35 – 44 (**2003**).
- [30] Suchan, P., Pulkrabová, J., et al. *Anal. Chim. Acta*, 520: 193 – 200 (**2004**).
- [31] Weiguang, X., Wang, X., Cai, Z. *Anal. Chim. Acta*, In Press (**2013**).
- [32] Papadakis, E. N., Vryzas, Z., Papadopoulou-Mourkidou, E. *J. Chromatogr. A*, 1127(1): 6 – 11 (**2005**).
- [33] Muller, A., Bjorklund, E., Von Holst, C. *J. Chromatogr. A*, 925(1): 197 – 205 (**2001**).
- [34] Ramos, J.J., Dietz, C., Gonzalez, M.J., Ramos, L. *J. Chromatogr. A*, 1152(1-2): 254 – 261 (**2007**).
- [35] Garrido, A., Martinez, I., Martinez, J.L., Lopez-Lopez, T. *Anal. Bioanal. Chem.*, 33(7-8): 1106 – 1118 (**2005**).
- [36] Antunes, P., Gil, O., Gabriela, M., Gil, B. *J. Supercrit. Fluids*, 25: 135 – 142 (**2003**).
- [37] Salata, G., Poyfair, T., Coronado, J., Degner, C., Jording, L. (Columbia Analytical Services). *Increasing Extraction Efficiency of Organic Contaminants from Solid Substrates using Freeze Drying: A Case Study*, **2004**.
- [38] Lambropoulou, D. A., Konstantinou, I. K., Albanis, T. A. *Anal. Chim. Acta*, 573 – 574: 223 – 230 (**2006**).
- [39] Falandysz, J., Wyrzykowska, B., Warzocha, J., Barska, I., et al. *Food Chem.*, 87: 17 – 23 (**2004**).
- [40] Ezzel, J., Richter, B. (Dionex). *Extraction of PCBs from Environmental Samples Using Accelerated Solvent Extraction (Application Note 316)*, Salt Lake City, **2000**.
- [41] Zwir-Ferenc, A., Biziuk, M. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 34(2): 95 – 103 (**2004**).
- [42] Agustin, M. R. R., Park, H.-M., Hong, S.-M., et al. *J. Chromatogr. A*, 1085: 278–284 (**2005**).
- [43] Papadakis, E.N., Vryzas, Z., Papadopoulou-Mourkidou, E. *J. Chromatogr. A*, 1127(1): 6 – 11 (**2006**).
- [44] Fernandez, J. L., Arrebola, F. J., Garrido, A., Martinez, J.L. *J. Chromatogr. A*, 1111(1): 97 – 105 (**2006**).
- [45] Guardia, M., Fernandez, M. L., Ayora, M.J., Ruiz-Medina, A. *J. Chromatogr. A*, 1108(2): 231 – 239 (**2006**).
- [46] Garrido, A., Martinez, J.L., Cruz, A.D., Gonzalez, M.J., Plaza, P. *Anal. Chim. Acta*, 558(1-2): 42 – 52 (**2006**).
- [47] Zitko, V., Hutzinger, O., Safe, S. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 6(2): 160 – 163 (**1971**).
- [48] Santos, F.J., Galceran, M.T. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 21(9-10): 672 – 685 (**2002**).
- [49] Hu, J., Fu, L., Zhao, X., et al. *Anal. Chim. Acta*, 640(1-2): 100 – 105 (**2009**).
- [50] Johansen, H.R., Becher, G., Greibrokk, T. *Anal. Chem.*, 66(22): 4068 – 4073 (**1994**).
- [51] Fotografía del GC Agilent 7890A, en <http://sct.uib.cat/es/Instruments-i-equipis-dels-Serveis-Cientificotecnics/Area-de-cromatografia/Cromatografia-de-gases.cid108074>
- [52] Fromme, H., Otto, T., Pilz, K., Neugebauer, F. *Chemosphere*, 39(10): 1723 – 1735 (**1999**).
- [53] Eljarrat, E., Caixach, J., Rivera, J. *Environ. Sci. Technol.*, 35(18): 3589 – 3594 (**2001**).
- [54] Grob, K., Grob Jr., K. *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1(1): 57 – 64 (**1978**).
- [55] Sigma-Aldrich. *Ficha de seguridad del hexano (Chromasolv® Plus, for HPLC, >95%)*.
- [56] Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. *Principios de Análisis Instrumental*, MC Graw-Hill/Interamericana, Madrid, **2001**.
- [57] U.S. Food and Drug Administration (FDA). *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance*, **2011**.
- [58] Mendoza, G., Gutierrez, L., et al. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 13(1): 67 – 74 (**2006**).
- [59] Tamayo, R., Ojeda, H., Cristi, R., Henriquez, O. *Arch. Med. Vet.*, 25(2) 181 – 186 (**1993**).
- [60] Riba, I., Casado-Martínez, C. et al. *Environ. Toxicol. Chem*, 23(2): 271 – 282 (**2004**).