



TESI DOCTORAL

Título: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs): Estudio de métodos cromatográficos. Aplicación a muestras de aire ambiente y alimentos.

Realizada por: Gemma Gotor Navarra

en el Centro: IQS School of Engineering

y en el Departamento: Química Analítica y Aplicada

Dirigida por: Dr. Francesc Broto-Puig

ELOGI DEL VIURE

*Estima el teu ofici,
la teva vocació,
la teva estrella,
allò pel que serveixes,
allò en què realment
ets un entre els homes,
esforça't en el teu quefer
com si de cada detall que penses,
de cada paraula que dius,
de cada peça que poses,
de cada cop de martell que dones,
en depengués la salvació de la humanitat.
Perquè en depèn, creu-me.*

Joan Maragall

AGRADECIMIENTOS

En estas páginas, me gustaría agradecer a todas aquellas personas que, directa o indirectamente, han hecho posible este trabajo.

A IQS, por haberme permitido realizar la Tesis Doctoral en la institución, compaginando mi trabajo diario en la Sección de Cromatografía con la investigación que ha formado este trabajo.

Al Dr. Francesc Broto, Director de la Tesis, Cap de la Secció de Cromatografia i dels Serveis Tècnics cromatogràfics durant aquests darrers anys, el meu mentor, company i, sobretot, el meu amic. Gracies per transmetrem la teva passió per la nostra feina. Gràcies per ensenyar-me a estimar la cromatografia, la ciència, la recerca i, especialment, per transmetrem la teva grandíssima vocació docent. És un plaer treballar al teu costat i desitjo poder seguir fent-ho durant molt de temps.

Al Dr. Jordi Abellà, Cap del Departament d'Anàlisi d'IQS, per haver-me acollit al departament. Especialment, li vull agrair el seu suport en moments difícils viscuts darrerament. M'agradaria destacar a més de la seva qualitat tècnica, la seva qualitat com a persona. T'ho agraeixo sincerament.

A tots els estudiants amb els que he tingut el plaer de treballar i que han col·laborat, amb la seva feina i dedicació a donar forma a aquest treball. Gràcies a la Cèlia, la Julia, el David, l'Anna Maria, la Maite i la Cristina. La veritat és que junts hem fet un gran treball d'equip i un vincle d'amistat que espero que segueixi d'ara endavant, encara que les nostres vides segueixin diferents camins.

A la Dra. Pepa Blanco y a la Dra. Judith Báguena, grupo de Garantía de Calidad de IQS. Os agradezco sinceramente, vuestra amistad, vuestra ayuda, vuestros sabios consejos siempre objetivos y realistas. Gracias por permitirme formar parte de vosotras, por haberme transmitido la pasión e importancia de la calidad en nuestro trabajo diario. También, por animarme siempre a no tirar la toalla y a no rendirme. Sabéis que os quiero de verdad.

Al Dr. Lluís Comellas, actual Vicerector de Recerca de la Universitat Ramon LLull i anterior Cap de la Secció de Cromatografia d'IQS, li vull agrair el que hem va ensenyar durant l'etapa que vàrem treballar junts. Em quedo amb els teus savis consells, la teva practicitat, el teu recolzament i, especialment, amb la teva amistat.

Al Dr. Miquel Gassiot, creador de la nostra Secció i pare de la Cromatografia, pels seus savis consells, pels seus ànims i, sobretot, per la passió que té per la nostra feina i per la cromatografia. No canviï mai, és un gran exemple a seguir per a les noves fornades de cromatografistes.

Al conjunt de persones que treballen o han treballat en algun moment a la Secció de Cromatografia. Gracies a la Cristina, al Jordi, a l'Eusebi, a l'Elisenda, a la Laura, la Eva, junts hem tirat endavant importants contractes i projectes, hem format un gran equip tant tècnic com humà. Vull fer una esmena especial pel Joel, col·laborador de la Secció, la nostra mà dreta, la paciència, l'ajuda incondicional i el bon rotllo. La seva actitud fa que el treball a la secció sigui més agradable. Gràcies per no tenir mai un no per resposta.

Al Dr. Josep Lluís Lliberia, actual Cap de Serveis Tècnics de la Secció de Cromatografia, perquè encara que portem treballant junts durant poc temps, m'has animat a tirar endavant i m'has ajudat a poder tancar aquesta fase. Desitjo que el nostre treball només acabi de començar, que pugui aprendre molt de tu i espero que junts podem realitzar molts projectes d'ara endavant.

Al Dr. Roger Estrada per fer possible que segueixi endavant una línia de treball apassionant i que sense la teva col·laboració seria impossible tirar endavant. Gràcies pel teu ajut incondicional, la teva comprensió i la teva paciència.

Als professors i membres del Departament d'Anàlisi pel seu suport incondicional i pels seus ànims durant tot aquest temps. Gràcies a la Lourdes, la Ariadna, el Jordi, l'Esther, l'Anna, la Laura, el Sergi. Formem un gran equip, som una gran família.

Als professors i membres d'altres Departament de l'IQS que han col·laborat a que aquest projecte sigui possible. Gràcies al Sergi, al Xavi i a la Bea.

A la Montse, una bona amiga i millor persona. La seva trajectòria, en aquest temps no ha estat fàcil però ha demostrat que l'amistat, la fidelitat i la constància sempre tenen una recompensa. Encara que la situació ha pogut ser injusta, ha tingut un final feliç, et tornem a tenir amb nosaltres. T'estimo moltíssim Montse i sé que no em fallaràs mai.

Als membres de PEINUSA, la Dra. Núria Vallmitjana i les seves companyes, la Sònia i la Norma, per deixar-me treballar amb elles i poder formar un bon grup de treball, lluitador, constant, i, perquè no, triomfador.

A la Dra. Ana Cuartero, una de las últimas incorporaciones dentro del grupo de Calidad. Gracias por escucharme, enseñarme y animarme siempre. Aunque no llevamos demasiado tiempo trabajando juntas, siento que hemos congeniado. No te rindas (tú me lo has dicho a mí), sólo así se consigue llegar a la meta con dignidad.

També vull agrair sincerament les empreses que han col·laborat a tirar endavant aquest treball:

Al Departament de Territori i Sostenibilitat de la Generalitat de Catalunya i els seus membres, la Núria Cots, l'Eva Pérez i el Xavier Guinart, pel treball conjunt realitzat durant tots aquests anys.

A la empresa *Dionex* y a sus miembros de aplicaciones por habernos permitido trabajar en su laboratorio antes de realizar la compra del sistema ASE 350.

A la empresa Cafés Bou S.A y a mi tío, por habernos hecho una clase magistral del trabajo que realizan y por habernos proporcionado las muestras de café que se han analizado en este trabajo.

A l'empresa ALLIC, per haver-nos deixat entrar a casa seva, per haver-nos prestat el seu ajut desinteressat i per haver-nos deixat aprofitar de les mostres de llet, per poder tirar endavant l'estudi de HAPs en aquest tipus de matriu.

Finalmente y con todo mi corazón, quiero dar las gracias a mi familia, por su apoyo incondicional. En especial a mi padre, por ayudarme siempre, por permitirme llegar hasta aquí, por mostrarme sus principios y cederme sus consejos. Eres y serás siempre mi ejemplo a seguir.

Igualment, agraeixo al Toni el seu recolzament incombustible, la seva paciència, els seus ànims i la seva força per fer-me tirar endavant. Gràcies per formar part de mi i estar sempre al meu costat. Ara comença una nova vida per nosaltres, en Jordi està a punt d'arribar. Tanquem una porta per obrir-ne una altra molt més important.

Os quiero mucho. Us estimo moltíssim.

*SUMARIO

El trabajo desarrollado en la presente tesis se centra en el estudio de la familia de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs). Esta familia de contaminantes orgánicos es de interés prioritario debido a sus propiedades como compuestos orgánicos persistentes, a su amplia distribución en el medio ambiente y a su elevada toxicidad sobre los seres vivos. Por estos motivos, en estos últimos años, se ha despertado un elevado interés en este tipo de compuestos en lo que respecta a su presencia y control tanto en el aire que respiramos como en los alimentos que ingerimos.

Así, la presente tesis se ha centrado en el estudio y conocimiento de esta compleja familia de compuestos tanto en el campo ambiental como en el de la alimentación.

Para ello, se han desarrollado los siguientes puntos:

- I. Se han desarrollado métodos cromatográficos tanto por HPLC-FLU como por HRGC-MS (EI/SIM), para la determinación de 24 de los compuestos de esta familia de contaminantes. Se han considerado tanto HAPs de interés en el ámbito medioambiental (entre los que se incluyen los HAPs de control prioritario para la EPA y para la ATDS) como alimentario (HAPS prioritarios para la SCF). Así, se han considerado los siguientes compuestos: naftaleno, acenafteno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, ciclopenta(cd)pireno, benzo(a)antraceno, criseno, 5-metilcriseno, los tres isómeros del benzofluoranteno (*benzo(j)fluoranteno*, *benzo(b)fluoranteno* y *benzo(k)fluoranteno*), benzo(a)pireno, benzo(e)pireno, dibenzo(ah)antraceno, benzo(ghi)perileno, indeno(123-cd)pireno) y los cuatro isómeros del dibenzopireno (*dibenzo(al)pireno*, *dibenzo(ae)pireno*, *dibenzo(ai)pireno* y *dibenzo(ah)pireno*). En ambos casos, se ha priorizado conseguir un mínimo tiempo de análisis con resoluciones adecuadas entre picos. Así, ha sido necesario trabajar con columnas con fases estacionarias específicas para este tipo de compuestos y con dimensiones que favorezcan maximizar la eficacia y velocidad (UHPLC y *Fast GC*). Además, se ha aprovechado la tecnología de UHPLC para reducir al máximo el tiempo de separación de los compuestos al trabajar con cromatografía líquida. Esta técnica ha permitido mejorar considerablemente la sensibilidad y así, conseguir llegar a los bajos niveles de concentración en que estos contaminantes se encuentran, especialmente, en las matrices alimentarias.
- II. Debido a la diversidad de compuestos que forman esta familia de contaminantes y a la complejidad de su separación, se ha considerado interesante la aplicación de los modelos de predicción basados en las metodologías QSRR, para conseguir describir el mecanismo que rige la separación de los HAPs cuando se trabaja con sistemas de cromatografía líquida. De esta manera, se consigue no sólo un conocimiento teórico del mecanismo de separación sino que permite ampliar el conjunto de HAPs a estudio. El modelo QSRR permite predecir los tiempos de retención de nuevos compuestos de la misma familia que no se han incluido en la presente tesis, pero que sí han podido ser incluidos por otros autores. Además, se ha estudiado la robustez del modelo de predicción cuando se cambia el gradiente de elución, la técnica cromatográfica (HRGC) o incluso cuando se cambia el tamaño de partícula del relleno de la columna y se trabaja

con sistemas de UHPLC. Además, se ha querido llegar un poco más lejos aplicando el modelo a una familia de compuestos derivados de los HAPs, los nitro-HAPs, que se caracterizan por tener la misma estructura base de hidrocarburo aromático policíclico pero con un grupo funcional nitro en su estructura. Así, de esta manera, se ha podido predecir también los tiempos de retención de esta nueva familia de compuestos, que tiene un cierto interés ambiental.

Con el conocimiento cromatográfico adquirido, se ha trabajado con estos contaminantes en diferentes matrices. Así:

- III. Se ha desarrollado un procedimiento para la determinación de HAPs en muestras de aire ambiente, a partir de la fracción PM10 de material particulado, con la finalidad de poder cumplir el RD 102/2011. En este caso, ha sido de vital importancia la relación entre IQS y el *Departament de Territori i Sostenibilitat de la Generalitat de Catalunya*. Ambas instituciones han colaborado mediante contratos de adjudicación directa y con concursos públicos, para poder desarrollar este procedimiento y aplicarlo a las muestras de la XVPCA. El procedimiento puesto a punto ha necesitado ser acreditado por la norma ISO 17025:2005, para poder aumentar la competitividad de IQS en la adjudicación de los concursos públicos. Así, ha sido necesario llevar a cabo un conjunto de actividades para conseguir la acreditación del procedimiento. El procedimiento ha sido validado convenientemente, se han incorporado una serie de controles tanto rutinarios como de control continuo, para poder realizar el seguimiento y control de la validez de los resultados obtenidos. Además, se han establecido procedimientos de cálculo de la incertidumbre, punto indispensable para su acreditación.
Con el procedimiento acreditado, se han analizado las muestras de la XVPCA correspondientes a los años 2009 a 2012 de todo el territorio catalán excepto de la ciudad de Barcelona. De manera, que ha sido posible realizar un estudio de la presencia de estos contaminantes en el aire tanto a nivel estacional como del área de captación (relacionado con el entorno de emisión).
- IV. Finalmente, se han desarrollado procedimientos para la determinación de los HAPs en dos matrices alimentarias: leches crudas tanto de vaca como de oveja y café en grano tanto verde como tostado. En estos casos, ha sido necesario optimizar convenientemente la etapa de preparación de la muestra, con la finalidad de reducir al máximo el efecto matriz, conseguir extraer estos compuestos de matrices con elevado contenido lipófilo y llegar al bajo nivel de concentración en que estos contaminantes se encuentran en las muestras. Sobre los procedimientos optimizados, en todos los casos, se han estudiado parámetros de calidad para asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos y se han aplicado a diferentes tipos de muestras.

*ACRÓNIMOS

| | |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AG | Algoritmos genéticos |
| AOAC | <i>Association of Analytical Communities</i> |
| ASE | <i>Accelerated solvent extracction</i> |
| ATSDR | <i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i> |
| BCF | Factor de bioconcentraci3n |
| CAS | <i>Chemical Abstract Service Number</i> |
| CERCLA | <i>Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act</i> |
| DAD | <i>Diode array detector</i> |
| DMAH | <i>Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya</i> |
| DTES | <i>Departament de Territori i Sostenibilitat de la Generalitat de Catalunya</i> |
| EI | <i>Electron ionization (formerly known as Electron Impact)</i> |
| GC | <i>Gas Chromatography</i> Cromatografía de gases |
| HAPs | Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos |
| HETP | Altura equivalente de plato teórico |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> Cromatografía líquida de alta eficacia |
| HPLC-FLU | <i>High performance Liquid Chromatography-Fluorecence</i> Cromatografía líquida de alta eficacia y detección de fluorescencia |
| HPLC-MS | <i>High performance Liquid Chromatography – Mass spectrometry</i> Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas |
| HPLC-UV | <i>High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet Detector</i> Cromatografía líquida de alta eficacia y detector de ultravioleta |
| HRGC-MS | <i>High Resolution gas chromatography – Mass Spectrometry</i> Cromatografía de gases de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas |
| IARC | <i>International Agency for Research on Cancer</i> |
| IC | Intervalo de confianza |
| IE | Impacto electrónico |
| ISO | <i>International Organization for Standardization</i> |
| JECFA | <i>FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i> |
| LC | Cromatografía Líquida |

| | |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| LOD | Límite de detección |
| log Kw | Coefficientes de partición octanol-agua |
| LOQ | Límites de cuantificación |
| m/z | Relación masa/carga |
| MIP | <i>Molecularly imprinted polymers</i> Polímeros de impresión molecular |
| MW | <i>Molecular weight</i> (masa molecular) |
| N | Número de platos |
| ND | No detectado |
| NIOSH | <i>The National Institute for Occupational safety and Health</i> |
| NIST | <i>National Institute of Standards and Technology</i> |
| PI | Patrón interno |
| PLS | <i>Partial Least Squares</i> (mínimos cuadrados) |
| PM | <i>Particulate Matter</i> Material particulado |
| POPs | <i>Persistent Organic Pollutants</i> (Contaminantes Orgánicos Persistentes) |
| QSRR | <i>Quantitative Structure-Chromatographic Retention Relationships</i> |
| RD | Real Decreto |
| RMSE | <i>Root Mean Square Error</i> Error cuadrático medio |
| S/N | <i>Signal to Noise ratio</i> Relación Señal Ruido |
| SCF | <i>Scientific Committee on Food</i> |
| SI | Sistema instrumental |
| SIM | <i>Selected Ion Monitoring</i> |
| SMS | Sobre Materia Seca |
| SPE | <i>Solid-Phase Extraction</i> Extracción en fase sólida |
| SRM | <i>Standard Reference Material</i> Material de Referencia Certificado |
| t_r | Tiempo de retención |
| t_rR | Tiempo de retención relativo |

| | |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| UHPLC | <i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i> |
| uma | Unidad de masa atómica |
| UPLC® | <i>Ultra-Performance Liquid Chromatography</i> |
| US EPA | <i>United State Environmental Protection Agency</i> |
| XVPCA | <i>Xarxa de Vigilancia i Previsió de la Contaminació Atmosférica de Catalunya</i> |
| 15 SCF-HAPs | 15 HAPs prioritarios por la SCF |
| 15+1 EPA-HAPs | 15 HAPs prioritarios para la EPA, no incluye acenaftileno pero incluye benzo(j)fluoranteno |
| 16 EPA-HAPs | 16 HAPs prioritarios para la EPA |

Nota: Los acrónimos correspondientes a los nombres de los diferentes Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos que aparecen en este trabajo, se incluyen en la [Tabla 3].

***INDICE**

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| AGRADECIMIENTOS..... | III |
| *SUMARIO | I |
| *ACRÓNIMOS..... | V |
| *INDICE | XI |
| *INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS. CARACTERÍSTICAS GENERALES | 4 |
| 1.1. Propiedades físico-químicas y estructurales de los HAPs. | 8 |
| 2. ORIGEN. FUENTES EMISORAS. | 11 |
| 3. DISTRIBUCIÓN Y PERSISTENCIA DE LOS HAPs EN EL MEDIO AMBIENTE..... | 15 |
| 4. VÍAS DE EXPOSICIÓN HUMANA A LOS HAPs. | 18 |
| 5. EFECTOS ADVERSOS: TOXICIDAD. | 19 |
| 6. LOS HAPs COMO CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES..... | 23 |
| 7. LEGISLACIÓN Y MÉTODOS OFICIALES RELACIONADOS CON EL CONTROL DE LOS HAPs EN EL AIRE AMBIENTE Y EN MATRICES ALIMENTARIAS. ANTECEDENTES..... | 27 |
| 7.1. LEGISLACIÓN RELACIONADA CON EL CONTROL DE LOS HAPs EN EL AIRE AMBIENTE. | 27 |
| 7.2. LEGISLACIÓN RELACIONADA CON EL CONTROL DE LOS HAPs EN ALIMENTOS. | 28 |
| 7.3. MÉTODOS OFICIALES PARA EL CONTROL DE LOS HAPs EN EL AIRE AMBIENTE Y EN MATRICES ALIMENTARIAS..... | 32 |
| 8. INTERÉS DEL ESTUDIO DE LOS HAPs EN MATRICES AMBIENTALES Y ALIMENTARIAS EN IQS. ANTECEDENTES..... | 33 |
| *OBJETIVOS..... | 35 |
| *CAPITULO I. DESARROLLO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS..... | 39 |
| 1. PATRONES DE TRABAJO. | 42 |
| 1.1. PATRONES COMERCIALES. | 43 |
| 1.2. DISOLUCIONES. | 45 |
| 1.3. CONSERVACIÓN, CONTROL Y CADUCIDAD DE LAS DISOLUCIONES PREPARADAS.. | 45 |
| 2. MÉTODO 1: HPLC-FLU. | 48 |
| 2.1. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE DETECCIÓN POR FLUORESCENCIA. | 50 |

| | | |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.2. | OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS. MÉTODO 15+1 EPA-HAPs. | 56 |
| 2.3. | ADAPTACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO 15+1 EPA-HAPs PARA LA DETERMINACIÓN DE BeP, CP(cd)P, 5-MeCrY Y LOS CUATRO ISÓMEROS DEL DiBP..... | 61 |
| 2.3.1. | Estudio de las condiciones cromatográficas para el BeP. | 61 |
| 2.3.2. | Estudio de las condiciones cromatográficas para los isómeros del DiBP..... | 63 |
| 2.3.3. | Estudio de las condiciones cromatográficas para el CP(cd)P y el 5-MeCrY..... | 69 |
| 2.4. | MÉTODO CROMATOGRÁFICO GLOBAL POR HPLC-FLU PARA LA DETERMINACIÓN DE 24 HAPs (16+1 EPA-HAPs CON 15 SCF-HAPs)..... | 71 |
| 2.5. | ESTUDIO DE PARÁMETROS DE RESPUESTA EN EL DETECTOR DE FLUORESCENCIA: LINEALIDAD Y LOD/LOQ. MÉTODO CROMATOGRÁFICO GLOBAL POR HPLC-FLU. | 74 |
| 2.5.1. | Estudio de linealidad. | 75 |
| 2.5.2. | Estudio de las concentraciones límite (LOD/LOQ). | 79 |
| 3. | MÉTODO 2: HRGC-MS. | 81 |
| 3.1. | ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE DETECCIÓN MS | 83 |
| 3.2. | OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA LA SEPARACIÓN DE LOS 24 HAPs A ESTUDIO POR HRGC-MS (EI). | 85 |
| 3.2.1. | Optimización de la selectividad/eficacia/resolución y tiempo de cromatograma..... | 85 |
| 3.2.2. | Optimización del tipo de columna. | 85 |
| 3.2.3. | Optimización del programa de temperaturas..... | 89 |
| 3.2.4. | Optimización de la presión de trabajo. | 92 |
| 3.2.5. | Optimización de la sensibilidad..... | 94 |
| 3.2.6. | Optimización de la temperatura de la línea de transferencia. | 94 |
| 3.2.7. | Optimización de la temperatura de la fuente de iones del detector..... | 95 |
| 3.2.8. | Optimización de la inyección..... | 98 |
| 3.3. | MÉTODO CROMATOGRÁFICO GLOBAL PARA LA SEPARACIÓN DE LOS 24 HAPs A ESTUDIO POR HRGC-MS (EI/SIM). | 101 |
| 3.4. | ESTUDIO DEL PATRÓN INTERNO | 104 |
| 3.5. | ESTUDIO DE PARÁMETROS DE DETECCIÓN CON EL ESPECTRÓMETRO DE MASAS: LINEALIDAD Y LOD/LOQ. MÉTODO CROMATOGRÁFICO GLOBAL PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS 24 HAPs A ESTUDIO POR HRGC-MS (EI/SIM). | 106 |
| 3.5.1. | Estudio de linealidad. | 107 |
| 3.5.2. | Estudio de las concentraciones límite (LOD/LOQ). | 110 |
| 3.6. | COMPARATIVA DE MÉTODOS: HRGC-MS (EI/SIM) vs. HPLC-FLU..... | 112 |
| 4. | MÉTODO 3: UHPLC-FLU..... | 114 |

| | | |
|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.1. | INTRODUCCIÓN A LA TÉCNICA DE UHPLC..... | 114 |
| 4.1.1. | Principales ventajas que aporta trabajar con columnas de tamaño de partícula pequeño. | 115 |
| 4.1.2. | Principales problemas que provoca trabajar con columnas de tamaño de partícula pequeño. | 119 |
| 4.1.3. | Cambio en el escalado de columnas. Consecuencias cromatográficas. | 120 |
| 4.2. | TRANSFERENCIA DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO DE DETERMINACIÓN DE LOS HAPs DE HPLC A UHPLC..... | 124 |
| 4.2.1. | Cálculos de transferencia de método (escalado de columnas)..... | 126 |
| 4.3. | OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO DE DETERMINACIÓN DE LOS 16 EPA-HAPs POR UHPLC. | 130 |
| 4.3.1. | Optimización de la separación. | 131 |
| 4.3.2. | Optimización de la sensibilidad..... | 136 |
| 4.4. | MÉTODO CROMATOGRÁFICO OPTIMIZADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS 16+1 EPA-HAPs POR UHPLC-FLU..... | 140 |
| 4.5. | AMPLIACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO OPTIMIZADO POR UHPLC-FLU A LA DETERMINACIÓN DE LOS 24 HAPs A ESTUDIO (16+1 EPA-HAPs CON 15 SCF-HAPs)..... | 141 |
| 4.6. | ESTUDIO DE PARÁMETROS DE LA RESPUESTA EN EL SISTEMA DE UHPLC-FLU: LINEALIDAD Y LOD/LOQ. MÉTODO CROMATOGRÁFICO GLOBAL..... | 145 |
| 4.6.1. | Estudio de linealidad. | 146 |
| 4.6.2. | Estudio de las concentraciones límite (LOD/LOQ). | 148 |
| 4.7. | COMPARATIVA DE MÉTODOS: HPLC-FLU vs. UHPLC-FLU. | 149 |
| *CAPITULO II. APLICACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS QSRR AL ANÁLISIS DE HAPs | | 151 |
| 1. | INTRODUCCIÓN A LAS METODOLOGIAS QSRR. INTERÉS DE APLICACIÓN. | 153 |
| 2. | SISTEMA CROMATOGRÁFICO DE PARTIDA. ANÁLISIS POR HPLC..... | 155 |
| 2.1. | PARÁMETRO CROMATOGRÁFICO: COEFICIENTE DE RETENCIÓN | 155 |
| 2.2. | DETERMINACIÓN DEL TIEMPO MUERTO. | 156 |
| 2.3. | CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS. TIEMPOS DE RETENCIÓN Y COEFICIENTES DE RETENCIÓN DE LOS ANALITOS A ESTUDIO..... | 157 |
| 3. | DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE LA METODOLOGÍA QSRR. | 159 |
| 3.1. | QUIMIOTECA VIRTUAL. | 159 |
| 3.2. | DESCRIPTORES MOLECULARES. | 160 |
| 3.2.1. | Selección de descriptores (I): selección basada en resultados bibliográficos y criterios químicos. | 160 |
| 3.2.2. | Selección de descriptores (II): Algoritmos de selección..... | 164 |

| | | |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.3. | MODELO QSRR..... | 167 |
| 3.3.1. | Modelos de predicción ensayados..... | 168 |
| 3.3.2. | Discusión de los resultados obtenidos para los diferentes modelos QSRR. Elección del modelo de predicción..... | 175 |
| 3.4. | EFICACIA DEL MODELO QSRR..... | 178 |
| 3.4.1. | Modelo QSRR de predicción. Aplicación..... | 179 |
| 3.4.2. | Estudio de posibles candidatos..... | 181 |
| 3.5. | ROBUSTEZ DEL MODELO QSRR..... | 183 |
| 3.5.1. | Cambios en las condiciones cromatográficas de HPLC (gradiente de elución) 184 | |
| 3.5.2. | Cambio en la técnica cromatográfica. Aplicación a la separación por HRGC. 189 | |
| 3.5.3. | Cambio en las dimensiones de la columna y en el sistema cromatográfico. Aplicación a la separación por UHPLC..... | 192 |
| 3.5.4. | Cambio en la familia de compuestos. Aplicación a una familia de derivados de los HAPs: los nitro-HAPs..... | 195 |
| 4. | RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE LA APLICACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS QSRR AL ANÁLISIS DE HAPs: MODELO DE PREDICCIÓN Y ESTUDIO DE ROBUSTEZ..... | 212 |
| | *CAPITULO III. DETERMINACIÓN DE HAPs EN MUESTRAS DE AIRE AMBIENTE..... | 215 |
| 1. | EL MATERIAL PARTICULADO COMO MATRIZ DE ESTUDIO..... | 219 |
| 2. | ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO INICIAL..... | 221 |
| 3. | DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE HAPs EN MUESTRAS DE AIRE AMBIENTE (filtros de partículas PM10)..... | 224 |
| 3.1. | TOMA DE MUESTRA PARA EL ANÁLISIS DE LOS HAPs. MANIPULACIÓN Y CONSERVACIÓN..... | 225 |
| 3.2. | MÉTODO CROMATOGRÁFICO..... | 227 |
| 3.3. | DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LOS HAPs..... | 231 |
| 3.3.1. | Extracción con ultrasonidos y Soxhlet..... | 231 |
| 3.3.2. | Extracción con ASE (<i>Accelerated Solvent Extraction</i>)..... | 237 |
| 3.3.3. | Resumen del procedimiento de preparación de muestra para la determinación de HAPs en filtros de partículas PM10..... | 246 |
| 4. | ACTIVIDADES RELACIONADAS CON EL CONTROL RUTINARIO DEL PROCEDIMIENTO. . | 247 |
| 5. | DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS HAPs EN MUESTRAS DE AIRE AMBIENTE. COMPARACIÓN CON LA NORMA UNE-EN 15549:2008..... | 259 |
| 5.1. | PROCEDIMIENTO INTERNO: IQS-CROMA PNT-A-0079..... | 259 |

| | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.2. | PUNTOS ESPECIFICADOS EN LA NORMA UNE-EN 15549:2008 PARA LA DETERMINACIÓN DE BaP EN MUESTRAS DE AIRE AMBIENTE INCLUIDOS EN EL PROCEDIMIENTO IQS-CROMA PNT-A-0079. | 262 |
| 6. | ACTIVIDADES RELACIONADAS CON LA GARANTIA DE CALIDAD DE LOS RESULTADOS. | 265 |
| 6.1. | VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO..... | 265 |
| 6.1.1. | Definición de los criterios de aceptación. | 266 |
| 6.1.2. | Descripción de las disoluciones que se utilizan en la validación..... | 266 |
| 6.1.3. | Resultados del estudio de validación del procedimiento para la determinación de HAPs en muestras de aire ambiente. | 269 |
| 6.1.4. | Resumen de los resultados de validación del procedimiento para la determinación de los HAPs en muestras de aire ambiente. | 281 |
| 6.2. | ACTIVIDADES DE CONTROL CONTINUO DEL PROCEDIMIENTO | 282 |
| 6.2.1. | Uso regular de materiales de referencia certificados. Recalculo de la incertidumbre..... | 282 |
| 6.2.2. | Participación en ejercicios de intercomparación o programas de ensayos de aptitud. | 287 |
| 7. | ANÁLISIS DE HAPs EN LAS MUESTRAS DE AIRE AMBIENTE CORRESPONDIENTES A LA XVPCA. | 290 |
| 7.1. | SELECCIÓN DE LOS FILTROS PM10 PARA EL ANÁLISIS DE HAPs..... | 293 |
| 7.2. | ESTUDIO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ANÁLISIS DE HAPs DE LOS FILTROS PM10 CORRESPONDIENTES A LA XVPCA..... | 295 |
| 7.2.1. | Estudio de la relación entre la concentración de partículas en los filtros y la concentración de HAPs. | 295 |
| 7.2.2. | Evolución de la concentración de los HAPs y del BaP en todo el periodo de muestreo. Estudio estacional..... | 296 |
| 7.2.3. | Comparación de la concentración de los HAPs y del BaP en las diferentes estaciones..... | 299 |
| 7.2.4. | Estudio de la proporción de cada uno de los HAPs en las muestras de las diferentes estaciones o áreas de captación..... | 303 |
| *CAPITULO IV. DETERMINACIÓN DE HAPs EN MATRICES ALIMENTARIAS: LECHE Y CAFÉ ... | | 307 |
| 1. | DETERMINACIÓN DE HAPs EN MUESTRAS DE LECHE. | 314 |
| 1.1. | LA LECHE COMO MATRIZ DE ESTUDIO..... | 314 |
| 1.1.1. | Fuentes de contaminación de HAPs en la leche. | 316 |
| 1.1.2. | Procedimientos de análisis para la determinación de los HAPs en la leche. Antecedentes bibliográficos..... | 316 |
| 1.2. | DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE HAPs EN MUESTRAS DE LECHE. | 317 |

| | | |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1.2.1. | Desarrollo del diseño de experiencias. | 317 |
| 1.2.2. | Disoluciones utilizadas para el diseño de experiencias..... | 322 |
| 1.2.3. | Resultados y discusión del diseño de experiencias..... | 323 |
| 1.2.4. | Redimensión del procedimiento de preparación de muestra. | 325 |
| 1.3. | DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS HAP8 EN MUESTRAS DE LECHE. | 327 |
| 1.4. | VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS HAP8 EN MUESTRAS DE LECHE. | 329 |
| 1.4.1. | Definición de los criterios de aceptación. | 330 |
| 1.4.2. | Descripción de las disoluciones que se utilizan en la validación..... | 332 |
| 1.4.3. | Resultados de validación del procedimiento para la determinación de los HAP8 en muestras de leche. | 333 |
| 1.5. | ANÁLISIS DE HAP8 EN MUESTRAS DE LECHE CRUDA. | 345 |
| 1.5.1. | Muestras de leche cruda de granja (vaca y oveja). Disposición, selección, transporte y conservación..... | 345 |
| 1.5.2. | Análisis de las muestras. Discusión de los resultados..... | 346 |
| 1.5.3. | Estudio del pico interferente..... | 355 |
| 2. | DETERMINACIÓN DE HAPs EN MUESTRAS DE CAFÉ EN GRANO..... | 373 |
| 2.1. | EL CAFÉ EN GRANO COMO MATRIZ DE ESTUDIO..... | 373 |
| 2.1.1. | Proceso de la producción del café en grano. | 374 |
| 2.1.2. | Fuentes de contaminación de HAPs en el café en grano. | 375 |
| 2.1.3. | Procedimientos de análisis para la determinación de HAPs en el café en grano. Antecedentes bibliográficos. | 376 |
| 2.2. | DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE HAPs EN MUESTRAS DE CAFÉ EN GRANO..... | 377 |
| 2.2.1. | Optimización de la preparación de la muestra. | 377 |
| 2.3. | DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE HAPs EN MUESTRAS DE CAFÉ EN GRANO..... | 383 |
| 2.4. | ANÁLISIS DE HAPs EN MUESTRAS DE CAFÉ EN GRANO. | 387 |
| | *CONCLUSIONES | 393 |
| | *BIBLIOGRAFIA..... | 399 |
| 1. | CITAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 401 |
| 2. | PUBLICACIONES Y POSTERS..... | 409 |
| | *ANEXO..... | 411 |

*INTRODUCCIÓN

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) constituyen una amplia familia de compuestos orgánicos que se caracterizan porque están formados por dos o más anillos aromáticos fusionados constituidos, únicamente, por átomos de carbono e hidrógeno. Se encuentran presentes de forma natural en el carbón y en el petróleo, y se originan por la incompleta combustión de la materia orgánica.

En estos últimos años, los HAPs han despertado un gran interés y preocupación debido a que han sido etiquetados como contaminantes por su elevado potencial cancerígeno y mutagénico.

El año 1775, de la mano del médico británico Percival Pott, se estableció un ligando entre la exposición a los compuestos químicos y el cáncer. El precedente era el elevado número de cánceres de escroto que presentaban los pacientes de cierta edad que habían trabajado durante años como deshollinadores. Cien años más tarde, von Volkmann observaba esta misma tendencia en los trabajadores de la industria del alquitrán. Estos hechos apuntaban directamente a derivados del carbón y del petróleo como causa principal de esta enfermedad. Sin embargo, los diversos intentos para corroborar la hipótesis resultaron infructuosos. En el 1918, finalmente, dos patólogos japoneses, Yamagawa y Inchikawa, confirmaron que el alquitrán inducía cáncer de piel después de su aplicación sobre la piel de las orejas de conejo (Vives, I., Grimalt, J.O. i Guitart R, 2001).

El alquitrán tiene una composición compleja, por lo que la identificación de los compuestos químicos responsables de las patologías halladas resultaba muy costoso. No fue hasta entrados los años veinte del siglo XX, que se descubrieron las propiedades fluorescentes de los compuestos responsables. Esta propiedad, conjuntamente con otras características, permitió identificar esta familia de compuestos en estas mezclas complejas y llegar a la conclusión que la familia de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos eran los responsables de los problemas de salud hallados (Propiedades de los hidrocarburos. Enciclopedia de la Salud y Seguridad en el Trabajo).

El primer Hidrocarburo Aromático Policíclico químicamente puro que se obtuvo, fue el benzo(a)antraceno. En el 1929, se sintetizó el primero de los compuestos de esta familia, el dibenzo(a,h)antraceno; y posteriormente, se aisló el benzo(a)pireno, que se etiquetó como el principal responsables del potencial cancerígeno del alquitrán (Agudo, 2010).

El principal origen de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (la pirolisis de la materia orgánica) y la contaminación por difusión (transporte atmosférico, dispersión y deposición), provoca la distribución de estos compuestos en todos los compartimentos ambientales. Así, este tipo de contaminantes ubicuos, se encuentran a niveles de concentración significativos en matrices como el agua potable, el aire que respiramos y los alimentos que ingerimos. Una vez asimilados por las plantas y los organismos acuáticos, los HAPs entran a formar parte de la cadena trófica. Sin embargo, su carácter lipofílico provoca una bioacumulación de este tipo de compuestos en los organismos vivos, causando efectos a largo plazo.

Así, los HAPs constituyen una familia de compuestos de gran importancia sanitaria y medioambiental, debido a su amplia distribución en el medio ambiente y a su potencial cancerígeno. Actualmente, no se tienen indicios que hagan pensar que los HAPs tengan un efecto perjudicial sobre la atmósfera, es decir, no contribuyen a la reducción de la capa de ozono ni al calentamiento global del planeta. Su peligrosidad está ligada a su elevada toxicidad sobre los seres vivos.

Por este motivo, en estos últimos años, se ha despertado un gran interés por este tipo de compuestos, por lo que respecta a su presencia y control en el aire ambiente y en alimentos. Así, esta tesis se centrará en el estudio de esta compleja familia de compuestos en estos dos tipos de matrices.

1. LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), son compuestos formados por anillos aromáticos fusionados, que no contienen heteroátomos. Así, se considera como el HAP más sencillo el naftaleno, con únicamente 2 anillos bencénicos fusionados, y entre los HAPs más complejos conocidos se encuentran el coroneno (mayor HAP de interés medioambiental), con seis anillos bencénicos fusionados alrededor de un anillo bencénico central, el pirantreno con ocho anillos y el ovoleno con diez. Sin embargo, el grafito, formado por diversas capas de anillos bencénicos fusionados, debería ser considerado como el “último HAP”, es decir, el de mayor masa molecular. (D.W. Connell, 1997)

En la [Figura 1], se presenta la estructura cristalina del grafito, donde queda claro que podría ser considerado el mayor de los HAPs existentes.

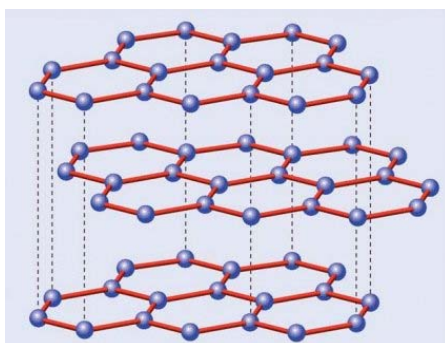


Figura 1. Estructura cristalina del grafito

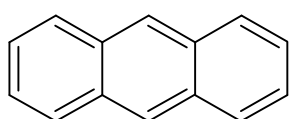
Los HAPs son compuestos que no se encuentran nunca por separado, sino que forman mezclas complejas y variables, donde la distribución de los diferentes congéneres está relacionada con el proceso en el que han estado generados.

Los HAPs en función de su estructura se pueden clasificar: (Baird, 2001)

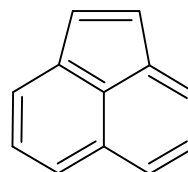
- Según el tipo de anillo: Alternantes y no alternantes.

Los HAPs alternantes contienen sólo anillos de seis átomos de carbono, mientras que los HAPs no alternantes son aquellos que, aparte de los anillos bencénicos, contienen anillos con un número impar de átomos de carbono (p.ej. anillos de 5 o 7).

En la [Figura 2], se presentan dos ejemplos representativos de compuestos de las dos categorías indicadas.



HAP alternante: Antraceno



HAP no alternante: Acenaftileno

Figura 2. Ejemplo de estructura de HAP alternante y no alternante, respectivamente.

- Según su estructura tridimensional: Planos o no planos.

Los HAPs planos son más estables, menos reactivos y biológicamente menos tóxicos. En cambio, los HAPs que no son planos, son más carcinogénicos y mutagénicos.

Aunque se conocen más de 600 congéneres, tanto en el ámbito medioambiental como en el de la alimentación, se han considerado un conjunto de HAPs de estudio prioritario. En la [Tabla 1], se incluyen estos compuestos y se indica el organismo por el cual se han considerado prioritarios.

La selección de los compuestos, en todos los casos, se basa en su mayor peligrosidad potencial, es decir, su toxicidad y genotoxicidad. Pero además, también se considera tanto la información disponible, como su mayor abundancia en las mezclas, aspecto ligado con una mayor probabilidad de exposición.

Tabla 1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos que se consideran de estudio prioritario por diferentes organismos, tanto en el campo medioambiental como en el de los alimentos. Se incluye el compuesto, su posible abreviatura, su número CAS y su masa molecular (MW). (EFSA E. F., 2008)

| Compuesto | Abreviatura (*) | Nº CAS | MW | Ambiental | | | Alimentario | |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|--------------|-----------|-------------|---------------|-------------|------------|
| | | | | EU HAPs | US EPA HAPs | US ATDSR HAPs | SCF HAPs | JECFA HAPs |
| Naftaleno | Na | 91-20-3 | 128,2 | | X | | | |
| Acenafteno | Ace | 83-32-9 | 154,2 | | X | X | | |
| Acenaftileno | Acy o Acey | 208-96-8 | 152,2 | | X | X | | |
| Fluoreno | Fl | 86-73-7 | 166,2 | | X | X | | |
| Fenantreno | Fe o Pa | 85-01-8 | 178,2 | | X | X | | |
| Antraceno | An o A | 120-12-7 | 178,2 | | X | X | | |
| Fluoranteno | F/Flt/Fa | 206-44-0 | 202,3 | | X | X | | |
| Pireno | Pyr o P | 129-00-0 | 202,3 | | X | X | | |
| Benzo(c)fluoreno | BcFl | 205-12-9 | 216,3 | | | | | X |
| Ciclopenta(c,d)pireno | CP(cd)P | 27208-37-3 | 226,3 | | | | X | |
| Benzo(a)antraceno | BaA | 56-55-3 | 228,3 | X | X | X | X | X |
| Criseno | Cry | 218-01-9 | 228,3 | X | X | X | X | X |
| 5-metilcriseno | 5MeCry | 3697-24-3 | 242,3 | | | | X | X |
| Benzo(b)fluoranteno | BbF | 205-99-2 | 252,3 | X | X | X | X | X |
| Benzo(j)fluoranteno | BjF | 205-82-3 | 252,3 | X | | X | X | X |
| Benzo(k)fluoranteno | BkF | 207-08-9 | 252,3 | X | X | X | X | X |
| Benzo(a)pireno | BaP | 50-32-8 | 252,3 | X | X | X | X | X |
| Benzo(e)pireno | BeP | 192-97-2 | 252,3 | | | X | | |
| Dibenzo(a,h)antraceno | DiBahA | 53-70-3 | 278,3 | X | X | X | X | X |
| Benzo(g,h,i)perileno | BghiP | 191-24-2 | 276,3 | X | X | X | X | |
| Indeno(1,2,3-c,d)pireno | IP | 193-39-5 | 276,3 | X | X | X | X | X |
| Dibenzo(a,e)pireno | DiB(ae)P | 192-65-4 | 302,3 | | | | X | X |
| Dibenzo(a,h)pireno | DiB(ah)P | 189-64-0 | 302,3 | | | | X | X |
| Dibenzo(a,i)pireno | DiB(ai)P | 189-55-9 | 302,3 | | | | X | X |
| Dibenzo(a,l)pireno | DiB(al)P | 191-30-0 | 302,3 | | | | X | X |

(*) Las abreviaturas utilizadas varían según las diferentes fuentes consultadas. En esta tabla, se incluyen las abreviaturas que se han utilizado a lo largo de la presente tesis para los diferentes HAPs.

CAS_ Chemical Abstract Service Number MW: molecular weight masa molecular).

US EPA (United State Environmental Protection Agency) ATDSR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) SCF (Scientific Committee on Food) JECFA (FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)

Como se puede observar en la [Tabla 1], existen 7 hidrocarburos aromáticos policíclicos que se consideran prioritarios en todos los casos: BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiB(ah)A e IP (marcados en negrita). Éstos coinciden con los que tienen una masa molecular media. En el ámbito medioambiental, se puede observar, que la tendencia es considerar HAPs de menor masa molecular mientras que en el campo alimentario, se prefiere la determinación de HAPs más pesados. Esto lo marca su mayor probabilidad en las mezclas. En el ambiente, se suelen encontrar HAPs menos pesados, ya que éstos son más volátiles y más solubles en agua. Sin embargo, en los alimentos como su contaminación puede ser ambiental o de proceso y, en muchos casos, implica bioconcentración, la ausencia de HAPs poco pesados es más probable.

La lista que elabora la ATSDR (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) incluye 17 compuestos que coinciden con los 16 HAPs prioritarios para la EPA (16 EPA-HAPs), exceptuando el naftaleno e incluyendo el benzo(e)pireno y el benzo(j)fluoranteno. (ATSDR, 1995)

La única diferencia entre las dos listas incluidas en el campo alimentario, la que propone el SCF (*Scientific Committee on Food*) y la JECFA (*FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) es que la SCF incluye el benzo(g,h,i)perileno y el ciclopenta(c,d)pireno, mientras que la JECFA incluye el benzo(c)fluoranteno. Este último HAP sólo está considerado por la JEFSA.

Cabe destacar, que la CERCLA (*Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act*), presenta con periodicidad bienal, la lista actualizada de sustancias (*National Priority List (NPL)*), elaborada por la EPA y la ATSDR, conjuntamente. Cada sustancia de la “*CERCLA Priority List of Hazardous Substances*” es candidata a la elaboración por parte de la ATSDR de un “perfil toxicológico”, y por tanto, está sujeta a un estudio de necesidades de actuación para su remediación. La lista no se elabora por orden estricto de toxicidad de las sustancias, sino atendiendo a los factores por los que se rige la ATSDR (peligrosidad potencial, información disponible y abundancia en mezclas). Cabe destacar, que en las listas elaboradas desde el año 1997, el benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno y los HAPs de forma genérica, han ocupado siempre un lugar entre los 10 primeros puestos de un total de 275 sustancias.

En la [Tabla 2], se muestran los diez primeros compuestos de la lista en las últimas cinco revisiones. En el año 2009 no se publicó ninguna lista, por esta razón, no se incluye. (ATSDR, 2015)

Tabla 2. Listado de las sustancias peligrosas, consideradas prioritarias por la CERCLA entre los años 2003 y 2015.

| Posición | 2003 | 2005 | 2007 | 2011 | 2013 y 2015 |
|----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | Arsénico | Arsénico | Arsénico | Arsénico | Arsénico |
| 2 | Plomo | Plomo | Plomo | Plomo | Plomo |
| 3 | Mercurio | Mercurio | Mercurio | Mercurio | Mercurio |
| 4 | Cloruro de vinilo | Cloruro de vinilo | Cloruro de vinilo | Cloruro de vinilo | Cloruro de vinilo |
| 5 | PCBs | PCBs | PCBs | PCBs | PCBs |
| 6 | Benceno | Benceno | Benceno | Benceno | Benceno |
| 7 | Cadmio | PAHs | Cadmio | Cadmio | Cadmio |
| 8 | PAHs | Cadmio | PAHs | BaP | BaP |
| 9 | BaP | BaP | BaP | PAHs | PAHs |
| 10 | BbF | BbF | BbF | BbF | BbF |

1.1. Propiedades físico-químicas y estructurales de los HAPs.

En la [Tabla 3], se presentan los HAPs considerados prioritarios tanto por la EPA como por la SCF como por la ATSDR con su estructura química, su fórmula molecular, sus puntos de fusión y ebullición, sus presiones de vapor (Pv), su solubilidad en agua (S) y el coeficiente de partición octanol-agua (log kw).

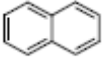
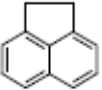
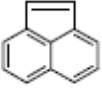
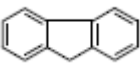
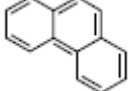
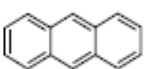
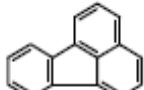
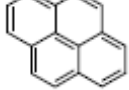
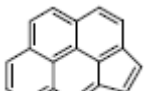
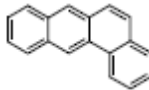
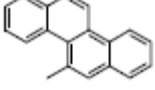
Se incluyen las propiedades físico-químicas que se consideran clave para entender su comportamiento medioambiental. En realidad, hay que tener en cuenta, que el contenido en los alimentos depende, en gran medida, de los HAPs que estén presentes en el aire (por deposición), en el suelo (por transferencia) o en el agua (deposición/transferencia).

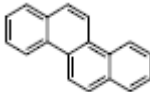
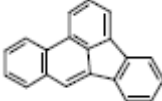
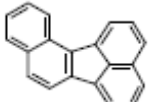
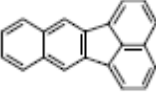
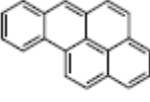
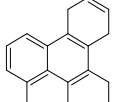
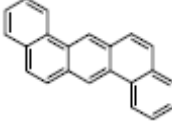
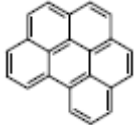
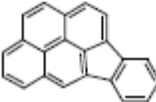
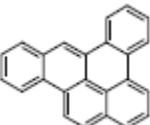
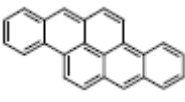
Los compuestos que forman parte de la familia de los HAPs, tienen características físico-químicas generales comunes:

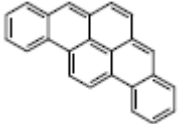
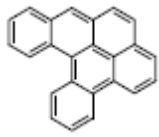
- Son sólidos a temperatura ambiente
- Tienen un elevado punto de fusión y ebullición
- Tienen presiones de vapor bajas
- Son poco solubles en agua (son solubles en disolventes orgánicos)
- Son altamente lipófilos

La estructura aromática de los HAPs les confiere una gran estabilidad y resistencia a ser atacados por diferentes agentes químicos. Sin embargo, presentan una considerable absorción de radiación ultravioleta-visible, son compuestos fotosensibles y en la mayoría de los casos, fluorescentes. De los compuestos incluidos en la [Tabla 3], los únicos que no son fluorescentes son el acenaftileno y el ciclopenta(cd)pireno. (D.W. Connell, 1997)

Tabla 3. Propiedades físico-químicas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos que se consideran interés ambiental por la EPA y la ATDSR, y alimentario por la SCF. (WHO (World Health Organization), 1998)

| Compuesto/ Abreviatura | MW | Propiedades FQ | Estructura química |
|------------------------------------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Naftaleno / Na | 128,2 | Pto Fusión (°C) = 81 Pto. Ebullición (°C) = 218 Pv (KPa) = 1,04E-2 S (mol/L) = 2,48E-4 log Kw = 3,4 |  |
| Acenafteno / Ace | 154,2 | Pto Fusión (°C) = 95 Pto. Ebullición (°C) = 279 Pv (KPa) = 2,9E-4 S (mol/L) = 2,55E-5 log Kw = 3,9 |  |
| Acenaftileno / Acy/Acey | 152,2 | Pto Fusión (°C) = 92 Pto. Ebullición (°C) = 265 Pv (KPa) = 8,9E-4 S (mol/L) = 2,58E-5 log Kw = 4,1 |  |
| Fluoreno / Fl | 166,2 | Pto Fusión (°C) = 116 Pto. Ebullición (°C) = 295 Pv (KPa) = 9,0E-5 S (mol/L) = 1,19E-5 log Kw = 4,2 |  |
| Fenantreno / Fe/Pa | 178,2 | Pto Fusión (°C) = 100 Pto. Ebullición (°C) = 340 Pv (KPa) = 1,6E-5 S (mol/L) = 7,24E-6 log Kw = 4,6 |  |
| Antraceno / An/A | 178,2 | Pto Fusión (°C) = 216 Pto. Ebullición (°C) = 342 Pv (KPa) = 8,0E-7 S (mol/L) = 4,10E-7 log Kw = 4,5 |  |
| Fluoranteno / F/Flt/Fa | 202,3 | Pto Fusión (°C) = 109 Pto. Ebullición (°C) = 375 Pv (KPa) = 1,2E-6 S (mol/L) = 1,29E-6 log Kw = 5,2 |  |
| Pireno / Pyr/P | 202,3 | Pto Fusión (°C) = 150 Pto. Ebullición (°C) = 393 Pv (KPa) = 6,0E-7 S (mol/L) = 6,68E-7 log Kw = 5,2 |  |
| Ciclopenta(c.d)pireno / Cp(cd)P | 226,3 | Pto Fusión (°C) = 170 Pto. Ebullición (°C) = 438 Pv (KPa) = 6,1E-7 (*) S (mol/L) = 1,48E-7 (*) log Kw = 5,7 (*) |  |
| Benzo(a)antraceno / BaA | 228,3 | Pto Fusión (°C) = 161 Pto. Ebullición (°C) = 400 Pv (KPa) = 2,8E-8 S (mol/L) = 6,14E-6 log Kw = 5,6 |  |
| 5-metilcriseno / 5MeCry | 242,3 | Pto Fusión (°C) = 217,8 Pto. Ebullición (°C) = 449 Pv (KPa) = 1,0E-8 S (mol/L) = insoluble (NR) log Kw = NR |  |

| Compuesto/ Abreviatura | MW | Propiedades FQ | Estructura química |
|-----------------------------------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Criseno / Cry | 228,3 | Pto Fusión (°C) = 258 Pto. Ebullición (°C) = 448 Pv (KPa) = 8,4E-10 S (mol/L) = 8,3E-9 log Kw = 5,7 |  |
| Benzo(b)fluoranteno / BbF | 252,3 | Pto Fusión (°C) = 168 Pto. Ebullición (°C) = 480 Pv (KPa) = 6,7E-5 S (mol/L) = 4,8E-9 log Kw = 6,1 |  |
| Benzo(j)fluoranteno / BjF | 252,3 | Pto Fusión (°C) = 165 Pto. Ebullición (°C) = 480 Pv (KPa) = 2,0E-6 S (mol/L) = 9,9E-9 log Kw = 6,1 |  |
| Benzo(k)fluoranteno / BkF | 252,3 | Pto Fusión (°C) = 216 Pto. Ebullición (°C) = 480 Pv (KPa) = 1,3E-11 (20°C) S (mol/L) = 3,01E-9 log Kw = 6,8 |  |
| Benzo(a)pireno / BaP | 252,3 | Pto Fusión (°C) = 178 Pto. Ebullición (°C) = 496 Pv (KPa) = 7,3E-10 S (mol/L) = 1,51E-8 log Kw = 6,5 |  |
| Benzo(e)pireno / BeP | 252,3 | Pto Fusión (°C) = 179 Pto. Ebullición (°C) = 493 Pv (KPa) = 7,60E-10 S (mol/L) = 2,59E-8 log Kw = 6,4 |  |
| Dibenzo(a,h)antraceno / DiBahA | 278,3 | Pto Fusión (°C) = 267 Pto. Ebullición (°C) = 524 Pv (KPa) = 3,7E-10 S (mol/L) = 1,80E-9 log Kw = 6,8 |  |
| Benzo(g,h,i)perileno / BghiP | 276,3 | Pto Fusión (°C) = 278 Pto. Ebullición (°C) = 545 Pv (KPa) = 1,4E-11 S (mol/L) = 9,41E-10 log Kw = 7,1 |  |
| Indeno(1,2,3-c,d)pireno / IP | 276,3 | Pto Fusión (°C) = 163 Pto. Ebullición (°C) = 536 Pv (KPa) = 1,3E-8 S (mol/L) = 6,87E-10 log Kw = 6,6 |  |
| Dibenzo(a,e)pireno / DiB(ae)P | 302,3 | Pto Fusión (°C) = 244 Pto. Ebullición (°C) = 552 Pv (KPa) = 9,4E-12 (*) S (mol/L) = 7,9E-11 (*) log Kw = 7,71 (*) |  |
| Dibenzo(a,h)pireno / DiB(ah)P | 302,3 | Pto Fusión (°C) = 317 Pto. Ebullición (°C) = NR Pv (KPa) = 9,4E-12 (*) S (mol/L) = 7,9E-11 (*) log Kw = 7,71 (*) |  |

| Compuesto/ Abreviatura | MW | Propiedades FQ | Estructura química |
|----------------------------------|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Dibenzo(a,i)pireno / DiB(ai)P | 302,3 | Pto Fusión (°C) = 282 Pto. Ebullición (°C) = NR Pv (KPa) = 9,4E-12 (*) S (mol/L) = 7,9E-11 (*) log Kw = 7,71 (*) |  |
| Dibenzo(a,l)pireno / DiB(al)P | 302,3 | Pto Fusión (°C) = 162 Pto. Ebullición (°C) = NR Pv (KPa) = 9,4E-12 (*) S (mol/L) = 7,9E-11 (*) log Kw = 7,71 (*) |  |

Pv: Presión de vapor a 25 °C; **S:** solubilidad a 25 °C; **logKw:** coeficiente de partición octanol-agua
NR: sin registro
(*) Web *ChemSpider*: Datos obtenidos por predicción utilizando *US Environmental Protection Agency EPI Suite™*

Dentro del conjunto de HAPs a estudio, si se relacionan sus propiedades físico-químicas con la masa molecular del compuesto se puede decir que:

- La presión de vapor tiende a disminuir al aumentar la masa molecular, mientras que los puntos de fusión/ebullición aumentan. Estas características, están relacionadas con la capacidad de los HAPs a permanecer en forma gaseosa en el medio ambiente. Los HAPs con más de cuatro anillos bencénicos, HAPs pesados (\geq BaP), debido a su baja presión de vapor, no permanecen mucho tiempo en la fase gaseosa sino que condensan y son adsorbidos sobre las partículas en suspensión que hay en el aire. Hay que tener en cuenta, que la presión de vapor depende de la temperatura, aumentando proporcionalmente. Así, es de esperar, que se encuentren HAPs poco pesados adsorbidos sobre las partículas durante los meses estacionales de más frío.
- Los coeficientes de partición octanol-agua (log Kw) oscilan entre 3 y 8, típicos de los compuestos lipófilos. Esta propiedad se incrementa a medida que aumenta la masa molecular del compuesto. Como consecuencia de estos elevados coeficientes de partición octanol-agua y de su baja solubilidad en agua, es de esperar que los HAPs se concentren en la fase orgánica de partículas sólidas de suelos o sedimentos. Además, si estos contaminantes son ingeridos por los organismos vivos, pueden quedar concentrados en el tejido adiposo de los mismos.

2. ORIGEN. FUENTES EMISORAS.

Los HAPs como familia de compuestos, tienen su origen principal en **la combustión incompleta de la materia orgánica** (formada básicamente por carbono e hidrógeno) a temperaturas relativamente elevadas (superiores a 500°C) y con falta de oxígeno.

El mecanismo de formación de estos compuestos durante la combustión es complejo, pero parece debido a la re-polimerización de fragmentos de hidrocarburos a través de reacciones radicalarias. El proceso transcurre a través de la formación de radicales libres producidos por la ruptura de enlaces carbono-carbono y carbono-hidrógeno, que reaccionan entre sí. En estas

Las fuentes productoras de HAPs para uso comercial no son demasiado relevantes, aunque cabe destacar su producción:

- Como patrones químicos de forma pura.
- Para uso farmacéutico, ya que forman parte de las soluciones para el tratamiento para la psoriasis.
- Como repelente de polillas, especialmente en el caso de los HAPs menos pesados.
- Para la fabricación de creosota¹.

Sin embargo, cabe destacar, que la mayoría de los HAPs se producen en fuentes secundarias de algunos procesos (formación no intencionada). Así, se conocen las fuentes agrícolas-ganaderas, la combustión en sectores no industriales (domésticas), las relacionadas con el transporte por carretera y las emisiones relacionadas con procesos industriales.

- Como fuentes agrícolas-ganaderas, se considera la combustión de la materia orgánica, como matorros o restos orgánicos.
- Como fuentes relacionadas con la combustión en sectores no industriales, se incluyen las fuentes domésticas donde destacan el uso de calefacciones, las cocinas o el humo del tabaco.
- Las fuentes relacionadas con el transporte por carretera están vinculadas con el motor de los vehículos. Los motores, generalmente funcionan con gasolina o gasoil. La emisión de los HAPs se produce tanto en fase vapor, como adheridos sobre las partículas emitidas, aunque se reduce su emisión con el uso de catalizadores. El gasoil es el tipo de carburante que más contamina debido a su mayor producción de partículas donde estos contaminantes quedan adheridos.
- Como fuentes industriales, se conocen muchos procesos que pueden producir HAPs de forma no intencionada. Se pueden destacar procesos relacionados con la industria del petróleo (producción de alquitrán y derivados), con la combustión de gas natural y carbón para producir energía, en la industria del aluminio, del hierro o del acero, o en procesos de incineración.

En el [Gráfico 1], se presenta la contribución de las principales fuentes emisoras de HAPs en el año 2011 en España. En el [Gráfico 2], se incluye la evolución de las principales fuentes emisoras de HAPs entre los años 2001 y 2011, también en España. (Ministerio de Agricultura, 2013)

Como se puede observar, en España los HAPs se originan, principalmente, por actividades agropecuarias (sobre todo por combustión de materia orgánica, como la quema de rastrojos). La segunda contribución en importancia corresponde a los procesos industriales con combustión, tanto con combustibles fósiles como no fósiles (acerías, altos hornos, valorización de residuos) con una tendencia mantenida en los últimos años registrados.

¹ La creosota se utiliza en la protección de la madera. La emisión de los HAPs se produce tanto en su fabricación, como en el uso de la madera tratada o en la incineración de la misma, en condiciones de falta de oxígeno

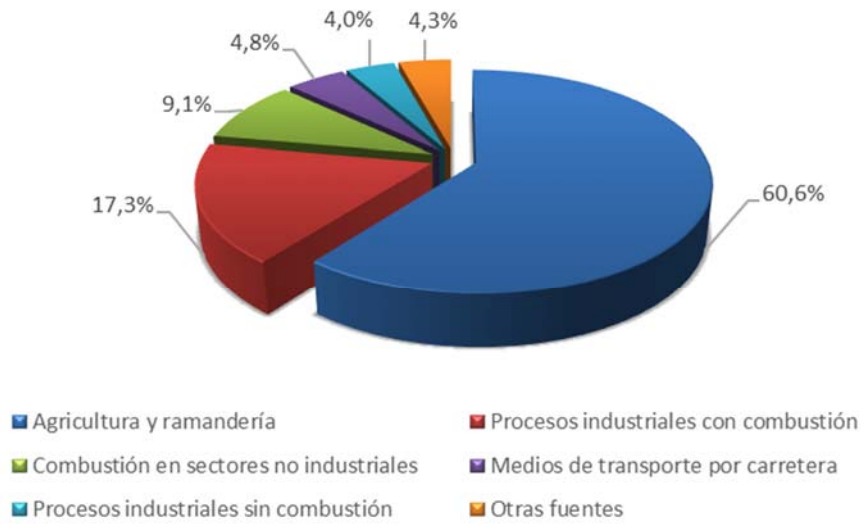


Gráfico 1. Contribución de las actividades por categorías a las emisiones de HAPs (2011). (Ministerio de Agricultura, 2013)

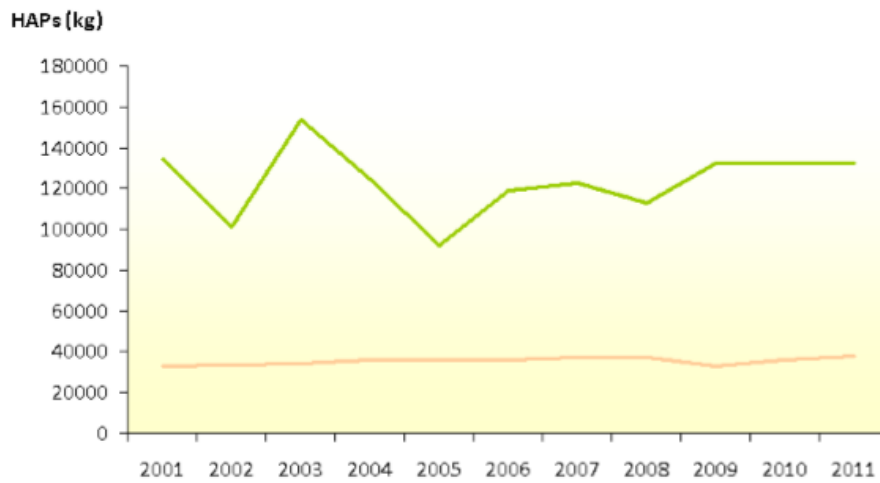


Gráfico 2. Tendencias temporales de las principales emisiones de HAPs (2001-2011). Línea verde: fuente agrícola-ganadera. Línea amarilla: procesos industriales con combustión. (Ministerio de Agricultura, 2013)

3. DISTRIBUCIÓN Y PERSISTENCIA DE LOS HAPs EN EL MEDIO AMBIENTE.

Los HAPs son contaminantes ubicuos en el medio ambiente. Su amplia distribución se debe, en gran medida, a que pueden ser transportados a largas distancias sin sufrir una degradación significativa.

Una vez liberados al medio ambiente, estos contaminantes pueden repartirse entre el aire, el agua, el suelo o los sedimentos. En la [Figura 4], se presenta un diagrama que muestra la distribución y dinámica de los HAPs en el medio ambiente.

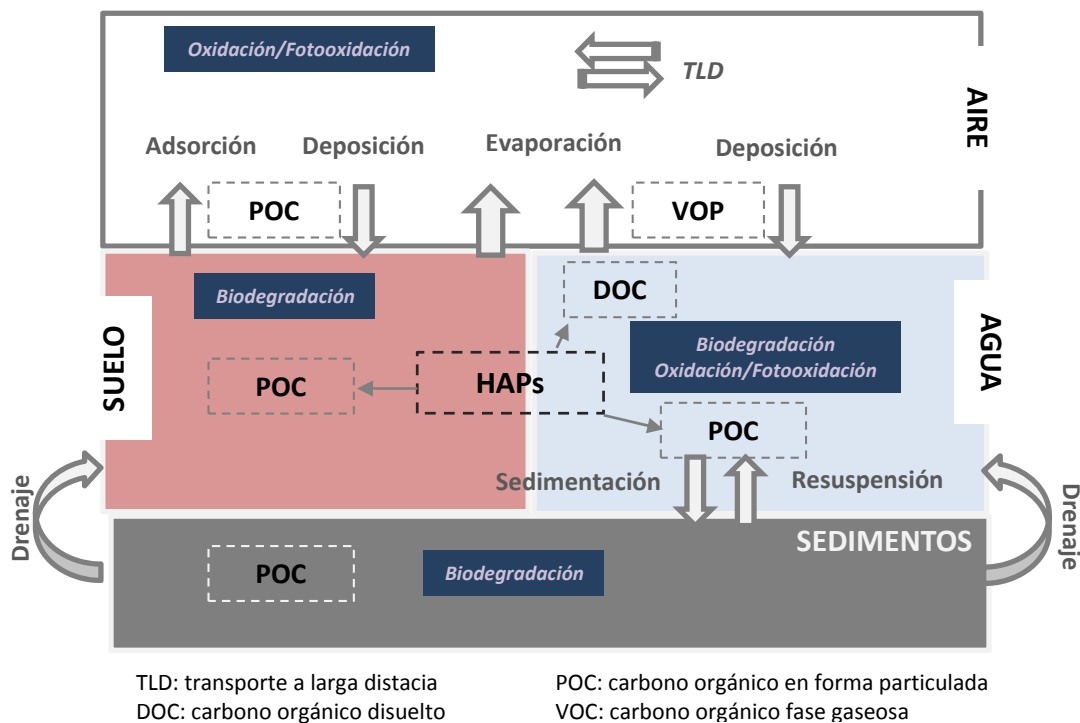


Figura 4. Diagrama de distribución y dinámica de los HAPs en el medio ambiente.

Los HAPs son emitidos principalmente a la atmósfera, donde pueden ser transportados en la fase vapor o adsorbidos en la fracción particulada. La distribución entre aire y materia particulada, bajo condiciones atmosféricas normales, depende de su carácter lipófilo, su presión de vapor y su solubilidad en agua. Así, los compuestos más volátiles, con dos o tres anillos aromáticos fusionados, son emitidos a la fase gas. Mientras que entre el 80-100% de los HAPs con 5 o más anillos aromáticos se encuentran asociados a las partículas atmosféricas (EC, 2001) (Liu, L. et al, 2007).

Los mecanismos de dispersión más comunes de los HAPs en la atmósfera son los siguientes:

- Transporte: el más importante es el viento.
- Transformación física: procesos por los que se agrupan entre ellos y con otros contaminantes formando aerosoles o partículas en suspensión.
- Deposición húmeda o seca.
- Procesos químicos de descomposición, es decir, reacciones con otros contaminantes en presencia de radiación solar o debido a las altas temperaturas.

Su presencia en aguas se debe, mayoritariamente, a residuos industriales, vertidos contaminantes y a deposiciones atmosféricas. Como los HAPs tienen una baja solubilidad en agua y tienen un carácter lipófilo, sólo los más solubles permanecerán en este medio aunque lo más probable es que tiendan a concentrarse en los sedimentos o a ser retenidos por los seres vivos que viven en el medio acuático.

A los suelos o sedimentos, los HAPs llegan procedentes de las aguas o por deposición atmosférica. Como se trata de sustancias apolares, quedan retenidas principalmente en los horizontes superiores ricos en materia orgánica. Su acumulación en este medio, es directamente proporcional a la masa molecular de los HAPs.

Con la finalidad de conocer su mayor o menor persistencia en cada uno de los compartimentos ambientales, es necesario conocer las vías de degradación de los HAPs en cada uno de los tres medios:

- Mecanismos de degradación de los HAPs en la **atmósfera**:
 - o Fotoxidación (se forman quinonas)
 - o Oxidación inducida por el ozono o el peroxiacetilnitrato (se forman dionas)
 - o Hidroxilación, es decir, la adición del radical [-OH] a un doble enlace para la formación de fenoles o dihidrodioles
 - o Reacción con los óxidos de nitrógeno (NO_x) o con el ácido nítrico presente en la atmósfera para obtener derivados nitrogenados
 - o Reacción con dióxido de azufre o ácido sulfhídrico atmosférico para la formación de ácidos sulfónicos

Es importante destacar, que los mecanismos de degradación de los HAPs en la atmósfera se ven favorecidos cuando éstos se encuentran en fase vapor. La falta de homogeneidad de los HAPs adsorbidos sobre la materia particulada, hace que sean mucho más estables y menos susceptibles a este tipo de reacciones, favoreciendo el transporte a larga distancia.

- Mecanismos de degradación de los HAPs en el **agua**:
 - o Oxidación fotoquímica
 - o Oxidación química, por la presencia de oxígeno elemental y de radicales peróxido. Éste es uno de los procesos de oxidación más importantes en el medio acuático
 - o Biodegradación por la acción de microorganismos acuáticos en condiciones aeróbicas. Este tipo de reacción disminuye al aumentar la masa molecular del congénere

- El mecanismo de degradación de los HAPs en el **suelo o sedimentos** es la biodegradación. Algunos microorganismos son capaces de degradar a los HAPs para utilizarlos como fuente directa de carbono.
 La biodegradación en el suelo depende de factores ambientales (temperatura, pH, concentración de oxígeno, tipo de suelo, nutrientes), de su carga orgánica, de las características de la población microbiana del suelo, de la estructura y el tamaño de las partículas en la que los HAPs se encuentren adheridos y de la presencia de determinados contaminantes como metales o cianidas que pueden ser tóxicas para los microorganismos.

En la [Tabla 4], se presenta el tiempo de vida medio² de 4 HAPs seleccionados. Este parámetro está directamente relacionado con el grado de persistencia de este tipo de compuestos en los diferentes medios (al aumentar el tiempo de vida medio, aumenta la estabilidad del HAP en ese medio).

Como se puede observar, falta información para poder completar toda la tabla. De los valores que se disponen se puede decir que, los HAPs pesados (con más de cuatro anillos aromáticos fusionados) tienen un tiempo de vida medio en aire de unos 7 días, permitiendo claramente el transporte a larga distancia; de unos 2 años en el agua y de hasta 4 años en el suelo. Así, parece lógico que en el medio en que es más probable encontrar este tipo de compuestos a largo plazo es en el suelo o los sedimentos pudiendo bioconcentrarse.

Tabla 4. Tiempo de vida medio ($t_{1/2}$) de 4 HAPs, expresados como valor promedio (WHO, Environmental Health Criteria 202. Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons., 1998)

| Compuesto | AIRE $t_{1/2}$ (días) | AGUA $t_{1/2}$ (años) | SUELOS $t_{1/2}$ (años) |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Benzo(a)pireno | 7,1 | 2,3 | 0,8 |
| Benzo(b)fluoranteno | - | 1,3 | - |
| Benzo(k)fluoranteno | 7,1 | - | 4,2 |
| Indeno(1,2,3-cd)pireno | - | - | 0,8 |

² Tiempo de vida medio ($t_{1/2}$) es el tiempo que debe transcurrir para que la concentración de un compuesto se reduzca a la mitad de su valor inicial. (Luque, 2011)

4. VÍAS DE EXPOSICIÓN HUMANA A LOS HAPs.

Debido a la presencia de los HAPs en los diferentes medios, la exposición humana a estos contaminantes puede ser muy variada.

Como vías de exposición directa cabe destacar la exposición laboral (a la que están sometidos trabajadores de industrias donde se queman productos derivados del petróleo) o la exposición al tabaco, que tienen los fumadores y la gente que los rodea en lugares cerrados.

A parte de estas vías de exposición más directas, existen otras más generales y que afectan a la mayoría de la población, como son la exposición ambiental y la dieta.

La **exposición ambiental** a los HAPs está ligada, principalmente, tanto al aire que respiramos como al agua que bebemos. Pero además, no hay que olvidar, que los animales, que posteriormente formaran parte de nuestra dieta, también están expuestos ambientalmente a este tipo de contaminantes (inhalación, contacto dérmico o ingestión), y éstos pueden estar sujetos a fenómenos de bioconcentración.

La bioconcentración es el fenómeno por el cual una sustancia química presenta concentraciones más elevadas en el organismo vivo que en el medio que lo envuelve. Esta propiedad está íntimamente ligada con el carácter lipófilo e hidrofóbico de los compuestos contaminantes.

El término bioconcentración incluye los conceptos de bioacumulación y biomagnificación. La bioacumulación implica la introducción de los contaminantes en el organismo por vía respiratoria o por la dieta, mientras que el concepto biomagnificación indica las posibilidades de que las sustancias se transfieran a través de la cadena trófica. Para los compuestos lipófilos y persistentes, como es el caso de los HAPs, la biomagnificación es el factor dominante.

Los HAPs tienen factores de bioconcentración conocidos que oscilan entre 100 y más de 100000, en función de la posibilidad de metabolización del organismo vivo en el que se estudia esta propiedad. Se conocen especies como las algas, los moluscos y pequeños invertebrados que no son capaces de metabolizar este tipo de compuestos y, consecuentemente, tienen una clara bioacumulación. En cambio, hay especies donde la metabolización es posible y, por tanto, la bioacumulación es menor. Aunque, hay que tener en cuenta, que los metabolitos pueden llegar a ser más tóxicos que sus propios precursores.

La **dieta** es la otra vía importante de exposición de los seres humanos a estos contaminantes. Los alimentos contaminados por HAPs, surgen en gran parte, por las prácticas de producción o cocinado, aunque también pueden contaminarse a través de la contaminación ambiental, ya que los HAPs están presentes en el aire ambiente (contaminación por deposición), en el suelo (contaminación por transferencia) o en el agua (deposición y transferencia). (SCF, 2002)

En la [Tabla 5], se presenta una estimación de la ingesta diaria de una persona adulta no fumadora de diferentes HAPs (ng/persona) teniendo en cuenta las tres vías principales de

exposición a este tipo de contaminantes (aire, agua consumida y alimentos). Los resultados que se presentan corresponden a estudios realizados en los años 90 en diferentes ciudades europeas. (SCF, 2002)

Hay que destacar, que la contribución por inhalación aumenta considerablemente cuando la persona es tanto fumadora como fumadora pasiva (Ej. En una persona fumadora de 20 cigarros/diarios aumentaría su contenido de BaP por inhalación hasta 210 ng).

Tabla 5. Estimación de la ingesta diaria de HAPs de una persona adulta no fumadora (ng/persona) considerando las diferentes vías de exposición. (SCF, 2002)

| Compuesto | Alimentos ¹ | Agua consumo ² | Aire ³ |
|------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------|
| | ng/persona | | |
| Antraceno | <30-640 | --- | 20 |
| Fenantreno | <330-4510 | --- | 400 |
| Fluoranteno | 600-1660 | 2-200 | 100 |
| Pireno | 600-1090 | 0,2-200 | 100 |
| Benzo(a)antraceno | <20-410 | 0,2-10 | 20 |
| Criseno | 200-1530 | 200 | 20 |
| Benzo(b)fluoranteno | 5-360 | 0,1-2 | 20 |
| Benzo(j)fluoranteno | <30 | 0,02-0,2 | --- |
| Benzo(k)fluoranteno | 40-140 | 0,02-2 | 20 |
| Benzo(a)pireno | 50-290 | 0,2-2 | 20 |
| Benzo(ghi)perileno | 120-360 | 0,2-2 | 20 |
| Indeno(1,2,3-cd)pireno | <20-460 | 0,2-2 | 20 |
| Dibenzo(ah)antraceno | <10-80 | --- | 2 |

¹Valores promedio de ingesta diaria teniendo en cuenta los diferentes alimentos y su consumo diario promedio por habitante.

²Rangos de concentraciones asumiendo una ingestión de agua diaria de 2L.

³Orden de magnitud asumiendo una relación de ventilación de 20 m³/día, excluyendo las vías de exposición directas.

5. EFECTOS ADVERSOS: TOXICIDAD.

Si los seres humanos están expuestos en cantidad y tiempo suficiente a estos contaminantes, ya sea por inhalación, por ingesta o, en menor proporción por vía cutánea, les pueden provocar efectos agudos o crónicos. (WHO, Environmental Health Criteria 202. Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons., 1998)

Los efectos agudos son consecuencia de una exposición puntual a dosis altas y, generalmente, se asocia con exposiciones laborales o accidentes. En cambio, los efectos crónicos son consecuencia de exposiciones prolongadas con dosis menores, aunque en este caso, debido a la propiedad de bioacumulación de estos compuestos, provocan que sus efectos sean importantes.

Dentro de los efectos crónicos se pueden destacar los “no carcinógenos” y los “carcinógenos”.

Los efectos “no carcinógenos” están relacionados con alteraciones en la piel (exposición cutánea), efectos respiratorios (inhalación en atmósferas laborales) o toxicidad reproductiva (vía oral), incluyendo una disminución de la fertilidad.

Los efectos carcinógenos son los más importantes y estudiados en este tipo de compuestos y es donde radica su elevada toxicidad.

Un gran número de HAPs, como algunos de los que forman parte del alquitrán o de mezclas complejas procedentes de emisiones de combustión, han mostrado carcinogenicidad experimental en animales y mutagenicidad en estudios *in vitro* e *in vivo*. (SCF, 2002).

No existe una evidencia clara para la carcinogenicidad de los HAPs en humanos. Sin embargo, existen numerosos estudios epidemiológicos y de mortalidad, que muestran un aumento de los casos de cáncer en humanos que han estado expuestos a mezclas de este tipo de compuestos, por ejemplo, trabajadores en refinerías de petróleo.

La actividad genotóxica de los HAPs se asocia, principalmente, con el grado de no planaridad del compuesto. En general, los HAPs planos son más estables, menos reactivos y biológicamente menos tóxicos. La mayor reactividad de los HAPs no planos se cree que resulta del creciente carácter olefínico de algunos enlaces aromáticos en la molécula. La sustitución por grupos metilo o por otros grupos en la estructura de los anillos puede provocar una distorsión de la planaridad de la molécula que puede traducirse en una reactividad y carcinogenicidad superior. (Bagó, 2005)

En realidad, los HAPs no son compuestos directamente cancerígenos, sino que necesitan de una activación metabólica para poder reaccionar con las macromoléculas celulares, como por ejemplo, el ADN. Por lo tanto, el potencial carcinogénico de los HAPs depende de sus metabolitos.

La **Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer**, la IARC (*International Agency for Research on Cancer*), establece unos criterios para elaborar una clasificación de diversas sustancias en relación a su carcinogenicidad en humanos (grupos 1, 2A, 2B, 3 y 4). En el caso de los HAPs, un buen número se encuentra clasificado en las diferentes categorías en función de los estudios y los datos publicados hasta el momento.

En el grupo 1, se incluyen las sustancias que son carcinogénicas.

En el grupo 2A se incluyen las sustancias que son probablemente carcinogénicas para los humanos. Se aplica en aquellos casos en que existe una evidencia limitada de la carcinogenicidad en humanos y una evidencia suficiente de la carcinogenicidad en experimentos con animales.

El grupo 2B se define para aquellas sustancias que son posiblemente carcinogénicas para los humanos. Se utiliza en aquellos casos que existe una evidencia limitada de la carcinogenicidad en humanos y una evidencia insuficiente en los estudios realizados con animales.

El grupo 3 se define para aquellos compuestos que no se pueden clasificar en relación a su carcinogenicidad en humanos. Se utiliza en aquellos casos, en que no hay evidencia de carcinogenicidad ni en humanos ni en experimentos con animales. Excepcionalmente, aquellas sustancias por las que no existe evidencia de la carcinogenicidad en humanos, pero en cambio, se dispone de pruebas suficientes en la experimentación animal, se pueden incluir en este grupo.

En la [Tabla 6], se presentan la clasificación realizada por la IARC de los 16 EPA-HAPs, los 15 SCF-HAPs y el BeP en función de su posible carácter carcinogénico en humanos. (IARC, Monographs on the evaluation of Carcinogenic risks to humans, 2015)

Aunque la IARC marca un potencial carcinogénico para cada uno de los HAPs de forma individual (tal y como se muestra en la [Tabla 6]), algunas de las mezclas que incluyen HAPs han sido clasificadas como categoría 1 (cancerígenas para los humanos), como los alquitranes, el hollín o

productos del tabaco, y la exposición a procesos de producción de aluminio, gasificación del carbón y el humo del tabaco, tanto en fumadores activos como pasivos. (IARC W. G., 2010)

En muchas ocasiones, debido a la complejidad de las mezclas de HAPs existentes, tanto el Comité Científico de los Alimentos, como la EPA, aceptan trabajar con el Benzo(a)pireno como indicador de peligrosidad de las mezclas. Se selecciona el BaP por ser uno de los HAPs más estudiados, uno de los más potentes carcinogénicos de la familia según IARC y, además, es relativamente fácil su separación y análisis, por lo que, en consecuencia, es del que se dispone de más datos.

Trabajar con un único compuesto indicador permite mantener el control de los niveles tanto ambientales como alimentarios de forma sencilla, pero por el contrario, se pierde la información del potencial tóxico de las mezclas. En alimentos, se acepta que el potencial carcinogénico de una mezcla es 10 veces el contenido de BaP de la misma. (SCF, 2002)

Numerosos autores y agencias, establecen factores de equivalencia tóxica de los HAPs respecto al BaP. Pero actualmente, aun no se han unificado los valores para obtener unos factores de equivalencia única.

Tabla 6. Clasificación IARC de los HAPs sobre la carcinogenicidad en humanos. Se incluye el grupo en el que se ha clasificado, el año de revisión y el volumen en el que está incluido. Además, se marca en negrita las sustancias carcinogénicas (Grupo 1) o con probable carácter carcinógeno para los humanos (Grupo 2A). (IARC, Monographs on the evaluation of Carcinogenic risks to humans, 2015)

| Compuesto | Grupo IARC | Año de actualización | Volumen |
|------------------------------|------------|----------------------|---------------------------|
| Naftaleno | 2B | 2002 | 82 |
| Acenafteno | 3 | 2010 | 92 |
| Acenaftileno | --- | --- | --- |
| Fluoreno | 3 | 2010 | 92, Sup 7 |
| Fenantreno | 3 | 2010 | 92, Sup 7 |
| Antraceno | 3 | 2010 | 92, Sup 7 |
| Fluoranteno | 3 | 2010 | 92, Sup 7 |
| Pireno | 3 | 2010 | 92, Sup 7 |
| Ciclopenta(c,d)pireno | 2A | 2010 | 92 |
| Benzo(a)antraceno | 2B | 2012 | 92, Sup 7 |
| 5-metilcriseno | 2B | 2010 | 92, Sup 7 |
| Criseno | 2B | 2010 | 92 |
| Benzo(b)fluoranteno | 2B | 2010 | 92 |
| Benzo(j)fluoranteno | 2B | 2010 | 92 |
| Benzo(k)fluoranteno | 2B | 2010 | 92 |
| Benzo(a)pireno | 1 | 2012 | 92, Sup 7 100F |
| Benzo(e)pireno | 3 | 2010 | 92, Sup 7 |
| Dibenzo(a,h)antraceno | 2A | 2010 | 92, Sup 7 |
| Benzo(g,h,i)perileno | 3 | 2010 | 92, Sup 7 |
| Indeno(1,2,3-c,d)pireno | 2B | 2010 | 92, Sup 7 |
| Dibenzo(a,e)pireno | 3 | 2010 | 92, Sup 7 |
| Dibenzo(a,h)pireno | 2B | 2010 | 92, Sup 7 |
| Dibenzo(a,i)pireno | 2B | 2010 | 92 |
| Dibenzo(a,l)pireno | 2A | 2010 | 92, Sup 7 |

Como se puede observar en la [Tabla 6], prácticamente todos los HAPs a estudio han estado considerados por la IARC de forma individual. El único compuesto no incluido es el acenaftileno. La gran mayoría de los compuestos están incluidos en los grupos 2B y 3, pero hay cuatro compuestos que están considerados carcinogénicos o potencialmente carcinogénicos para los humanos. Así, el benzo(a)pireno está clasificado dentro del grupo 1, y su inclusión en este grupo se ha actualizado en el año 2012. El dibenzo(a,h)antraceno, el dibenzo(a,l)pireno y el ciclopenta(c,d)pireno pertenecen al grupo 2A y su última actualización es del año 2010.

En lo que se refiere a la **genotoxicidad** de los HAPs, cabe destacar, que de un grupo de 33 compuestos de esta familia incluidos en el último documento redactado por la IPCS (*International Program on Chemical Safety*), sólo 15 presentan claras evidencias de genotoxicidad en células somáticas *in vivo*.

En la [Tabla 7] se presenta la conclusión de la evaluación sobre la posible genotoxicidad de los HAPs a estudio. (SCF, 2002)

Tabla 7. Genotoxicidad de los HAPs. Evaluación de los compuestos de forma individualizada

| Compuesto | Conclusión de la evaluación | Valoración del resultado |
|------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Naftaleno | Probablemente No genotóxica | <i>In vitro</i> : Negativo limitado <i>In vivo</i> : Negativo |
| Acenafteno | Resultados insuficientes | <i>In vitro</i> : No claros <i>In vivo</i> : Sin resultados |
| Acenaftileno | Resultados insuficientes | Resultados no claros en estudios con bacterias |
| Fluoreno | Resultados insuficientes | <i>In vitro</i> : No claros <i>In vivo</i> : Sin resultados |
| Fenantreno | Resultado equívoco | <i>In vitro</i> : No claros <i>In vivo</i> : Negativos o rozando el positivo |
| Antraceno | Resultados insuficientes | <i>In vitro</i> : Positivos <i>In vivo</i> : Sin resultados |
| Fluoranteno | Resultado equívoco | <i>In vitro</i> : No claros <i>In vivo</i> : Evidencia de unión con DNA |
| Pireno | No genotóxica | <i>In vitro</i> : Negativo <i>In vivo</i> : Negativo |
| Ciclopenta(c,d)pireno | Genotóxico | <i>In vitro</i> : Positivos <i>In vivo</i> : Unión con DNA |
| Benzo(a)antraceno | Genotóxico | <i>In vitro</i> : Positivos <i>In vivo</i> : Múltiple punto final |
| 5-metilcriseno | Genotóxico | <i>In vitro</i> : Positivos <i>In vivo</i> : Unión con DNA |
| Criseno | Genotóxico | <i>In vitro</i> : Positivos <i>In vivo</i> : Múltiple punto final |
| Benzo(b)fluoranteno | Genotóxico | <i>In vitro</i> : Positivos <i>In vivo</i> : Múltiple punto final |
| Benzo(j)fluoranteno | Genotóxico | <i>In vitro</i> : Positivos <i>In vivo</i> : Unión con DNA |
| Benzo(k)fluoranteno | Genotóxico | <i>In vitro</i> : Positivos <i>In vivo</i> : Unión con DNA |
| Benzo(a)pireno | Genotóxico | <i>In vitro</i> : Positivos <i>In vivo</i> : Múltiple punto final |
| Benzo(e)pireno | Resultado equívoco | <i>In vitro</i> : No claros <i>In vivo</i> : Inconsistentes |

| Compuesto | Conclusión de la evaluación | Valoración del resultado |
|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Dibenzo(a,h)antraceno | Genotóxico | <i>In vitro</i> : Positivos <i>In vivo</i> : Múltiple punto final |
| Benzo(g,h,i)perileno | Genotóxico | <i>In vitro</i> : Positivos <i>In vivo</i> : Unión con DNA |
| Indeno(1,2,3-c,d)pireno | Genotóxico | <i>In vitro</i> : Positivos <i>In vivo</i> : Unión con DNA |
| Dibenzo(a,e)pireno | Genotóxico | <i>In vitro</i> : Positivos <i>In vivo</i> : Unión con DNA |
| Dibenzo(a,h)pireno | Genotóxico | <i>In vitro</i> : Positivos <i>In vivo</i> : Unión con DNA |
| Dibenzo(a,i)pireno | Genotóxico | <i>In vitro</i> : Positivos <i>In vivo</i> : Positivos |
| Dibenzo(a,l)pireno | Genotóxico | <i>In vitro</i> : Positivos <i>In vivo</i> : Unión con DNA |

En general, parece que la evidencia de genotoxicidad del compuesto es superponible con un potencial carcinógeno del mismo. Este hecho está de acuerdo con la relación en el mecanismo entre la formación de aductos con el ADN, mutaciones y el resultado del cáncer después de la exposición a los HAPs.

6. LOS HAPs COMO CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES.

Para que una sustancia o grupo de sustancias sea considerada como Contaminante Orgánico Persistente (*Persistent Organic Pollutants, POPs*), es necesario que tenga unas determinadas propiedades de persistencia, bioacumulación, transporte a larga distancia y toxicidad.

Estas características están definidas dentro del Convenio de Estocolmo (2001). Dicho Convenio ratifica el acuerdo internacional sobre el control de 12 Contaminantes Orgánicos Persistentes y, a su vez, muestra la posibilidad de incluir otras sustancias o grupos de sustancias para las que existe una evidencia creciente de su impacto potencial. Entre este último grupo de compuestos, se incluyen los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.

Se puede decir que los HAPs están incluidos como candidatos a POPs, ya que, se considera que tienen una importancia ambiental prioritaria pero no se tiene su evaluación completa. Los datos disponibles sugieren la necesidad de realizar más estudios sobre su impacto ambiental y sus efectos toxicológicos.

Los HAPs como POPs. Propiedades.

- **Persistencia**

Según el Convenio un compuesto es persistente si tiene un tiempo de vida medio superior a 2 días en el aire (para que pueda existir transporte a larga distancia), superior a 2 meses en agua y superior a 6 meses en suelos o sedimentos. (UN, 2001)

En la [Tabla 4] se incluyen los tiempos de vida medio de algunos de los HAPs. Éstos cumplen con los criterios establecidos, pero falta información de más compuestos de la familia.

- **Bioacumulación**

Según el Convenio un compuesto es bioacumulable si tiene un factor de bioconcentración (BCF)³ superior a 5000 o, si faltan datos al respecto que tenga un log kw superior a 5. Además, el producto debe presentar preocupación por su elevada toxicidad o ecotoxicidad. (UN, 2001)

Los HAPs pesados (más de cuatro anillos aromáticos fusionados) por su carácter lipófilo tienen un log kw superior a 5, por lo tanto, cumplen este requisito que exige el Convenio. Sin embargo, tal y como se ha indicado en el apartado anterior (5. *Efectos adversos: toxicidad*), faltan datos que corroboren la toxicidad real de los HAPs.

- **Transporte a larga distancia**

Según el Convenio para que una sustancia se considere potencialmente activa en el transporte a larga distancia, deben existir evidencias del compuesto contaminante en zonas lejanas a la de su fuente emisora y datos de transferencia a diferentes medios a través del aire, agua o de aves migratorias, teniendo un tiempo de vida medio en el aire superior a dos días. (UN, 2001)

Los HAPs, como se ha comentado, son contaminantes ubicuos, que están presentes en cualquiera de los compartimentos ambientales. Además, su baja volatilidad, su elevada hidrofobicidad y su baja reactividad, hacen que puedan ser transportados a largas distancias mediante el sistema *Multi-Hop*. Es decir, pueden ser transportados en estado gaseoso, adheridos a las partículas del aire, en el agua o en la materia orgánica del suelo, prácticamente sin sufrir transformaciones. (NCBI, 2014)

Se han publicado estudios con niveles de HAPs en sedimentos de zonas del ártico que son 10 veces superiores a los obtenidos como niveles de fondo.

³ El factor de bioconcentración (BCF) es la cifra que expresa la relación entre la concentración de la sustancia en un organismo y la concentración de la misma en el ambiente. Se calcula dividiendo la concentración en los tejidos entre la concentración de exposición o en el medio circundante. De esta manera, un BCF de 1000 significa que el organismo concentra el producto hasta un valor mil veces superior al del ambiente.

- **Toxicidad**

Según el Convenio para que una sustancia produzca efectos adversos sobre la salud humana o el medio ambiente deben existir datos de toxicidad y ecotoxicidad que evidencien su mal potencial. (UN, 2001)

Tal y como se ha comentado en el apartado 5 (Capítulo I), los HAPs son compuestos potencialmente tóxicos pero faltan evidencias claras de su afectación sobre los seres humanos.

Como se puede observar, los HAPs tienen las características necesarias para que ser considerados como POP, pero éstas son insuficientes para que sean incluidos dentro del Convenio de Estocolmo. Faltan datos que acaben de corroborar estas propiedades y, además, se deben conocer las posibilidades, limitaciones e implicaciones de reducir sus emisiones a nivel global. Su regulación debe ser viable económicamente y su eliminación, reducción y control viable técnicamente.

Actualmente, existe regulación relacionada con el control de estos contaminantes (apartado 7, Capítulo I, página 27).

En lo que hace referencia a la reducción de las emisiones de estos contaminantes, es importante incidir sobre los procesos que son sus principales fuentes de emisión. Sin embargo, en muchas ocasiones, la disminución de las emisiones tiene un coste tan elevado o una eficacia tan baja que no compensa ni técnica ni económicamente. Cabe destacar que en la última revisión del Convenio llevado a cabo por el Comité en el año 2009, los HAPs se han considerado como uno de los grupos de compuestos para los que se propone reducir las emisiones utilizando las mejoras técnicas disponibles. Dentro de toda la familia de los HAPs, propone el control con los siguientes compuestos: BaP, BbF, BkF e IP. Se centra en la reducción de las emisiones dentro de la producción de carbón, de la industria del aluminio, en las combustiones domésticas (no industriales) y en el uso de estos compuestos como conservantes de la madera (Creosota).

En la [Tabla 8], se presentan, en forma de ejemplo, las medidas que se deberían de tomar con la finalidad de reducir las emisiones de los HAPs procedentes de las combustiones domésticas, incluidas en el documento de las mejores técnicas disponibles para el control de las emisiones de POPs. Se incluye, además de la medida, la efectividad de esta reducción, el coste y la posibilidad técnica o económica de realizar esta reducción. (EU_BREFs, 2009)

Tabla 8. Medidas y consecuencias de la reducción de los niveles de emisiones de HAPs procedentes de la combustión no industrial (doméstica o combustión de la madera).

| Medida | Efectividad | Coste | Posibilidad o riesgo |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Uso de carbón y madera secos como combustibles. Nota: se considera seco cuando han estado almacenados, como mínimo, entre 18 y 24 meses | Alta efectividad | ---- | --- |
| Diseño de sistema de calefacción para combustibles sólidos que aseguren una correcta combustión, es decir, se propone incluir: <ul style="list-style-type: none"> - Zona de gasificación - Combustiones con cerámicas - Zonas de convección efectivas | 55% | Medio | Se debe negociar con los fabricantes de estufas |
| Introducir instrucciones técnicas para la eficiencia operacional en el uso de todo tipo de estufas, incluidas las de leña | 30-40% | Bajo | Podría lograrse también con una educación pública, junto con instrucciones prácticas en los diferentes tipos de estufas |
| Medidas secundarias relacionadas con la reducción de las emisiones de partículas o de quema de HAPs | <5% | Medio-alto | Los costes están relacionados con el tamaño de la instalación y la reutilización del carbón producido como residuo |

Las emisiones de los HAPs procedentes de la combustión no industrial (doméstica o relacionada con la combustión de la madera), se pueden reducir optimizando las formas de calentamiento y con conciencia y formación pública referente a sus usos y posibles peligros.

En resumen, en un primer nivel es posible reducir las emisiones de los HAPs sin mucho esfuerzo, pero si éstas se quieren reducir de forma significativa, es necesario realizar una importante inversión económica, haciendo realmente difícil la reducción de estos contaminantes a corto plazo.

Por esta razón, el estudio de estos contaminantes tanto en matrices ambientales como alimentarias tiene una importancia actual prioritaria.

7. LEGISLACIÓN Y MÉTODOS OFICIALES RELACIONADOS CON EL CONTROL DE LOS HAPs EN EL AIRE AMBIENTE Y EN MATRICES ALIMENTARIAS. ANTECEDENTES.

El carácter tóxico de esta familia de compuestos y su amplia distribución en el medio ambiente han garantizado su inclusión en la legislación tanto de control medioambiental como alimentario.

7.1. LEGISLACIÓN RELACIONADA CON EL CONTROL DE LOS HAPs EN EL AIRE AMBIENTE.

En el campo medioambiental, existe legislación relacionada con el control de los HAPs tanto en el aire, como en el agua, como en sedimentos. En este caso, y debido al estudio realizado en la presente tesis, se presentará únicamente la legislación relacionada con el control de los HAPs en el aire que respiramos, es decir, en las inmisiones atmosféricas.

En el año 1996, el consejo Medioambiental aprobó la Directiva 96/92/EC para el control de la calidad del aire. Esta directiva, cubría la revisión de la legislación ya existente en este campo e incluía nuevos estándares para el control de contaminantes no incluidos hasta el momento. Además, señalaba las fechas para el desarrollo de las directivas hijas que hacían referencia a diferentes contaminantes, entre ellos, los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.

Estas nuevas normativas, tenían como objetivo armonizar estrategias de monitorización, de métodos de medida, calibración y calidad con la finalidad de obtener datos comparables entre los países de la Unión Europea y asegurar así, una buena información pública.

La directiva hija, que está relacionada con el control de los HAPs, es la **Directiva 2004/107/EC** del Parlamento Europeo y del Congreso del 15 de diciembre de 2004 relativa “**al arsénico, cadmio, mercurio, níquel y los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el aire ambiente**” modificada este último año en la **Directiva 2015/1480/EC** del 28 de agosto de 2015 (sólo modifica algunos anexos). En esta directiva, queda reflejado el interés a nivel de la UE de probar los beneficios que aporta a la salud humana el hecho de reducir la concentración de los HAPs en el aire que respiramos, procurando, en todo momento, que la reducción sea viable económicamente. Esta directiva queda traspuesta a nivel español en el **Real Decreto 812/2007**, últimamente actualizada en el **Real Decreto 102/2011**, de 28 de enero. El Real Decreto establece los valores objetivos de concentración de los compuestos a estudio en el aire, con el fin de proteger la salud de las personas y el medio ambiente. Además, establece métodos y criterios de evaluación y medición de la concentración, así como la información que ha de suministrarse a los ciudadanos a fin de su posterior remisión a la UE. (Directiva 2004/107/EC); (Directiva 2015/1480); (Real Decreto 812/2007); (Real Decreto 102/2011)

En lo que hace referencia a los HAPs, propone el control de 7 compuestos de la familia: BaA, BbF, BjF, BkF, BaP, DiBahA e IP sobre la fracción PM₁₀⁴, pero establece como marcador de los HAPs en inmisiones al BaP, para el que indica su valor objetivo (1 ng/m³), además del margen superior e inferior de evaluación (60% del valor objetivo y 40% del valor objetivo, respectivamente).

7.2. LEGISLACIÓN RELACIONADA CON EL CONTROL DE LOS HAPs EN ALIMENTOS.

Las primeros intentos, relacionados con el control y establecimiento de los niveles máximos de determinados contaminantes en alimentos dentro del marco de la Unión Europea, fueron establecidos por el Consejo Regulador el año 1993 (EEC nº 315/93). Aunque no fue hasta el año 2001, dentro del Reglamento (CE) nº 466/2001, donde se establecieron realmente los niveles máximos de determinados contaminantes; éste reglamento fue substituido el año 2006.

Referente a los HAPs, el **Reglamento (CE) nº 1881/2006** de la Comisión, a fin de proteger la salud pública establecía que era preciso fijar el contenido máximo de BaP en determinados alimentos como aceites y grasas, así como alimentos sometidos a procesos de ahumado y secado. También indicaba que era necesario fijar el contenido máximo de BaP para alimentos expuestos a un alto nivel de contaminación ambiental por bioacumulación. En este caso, sólo se centraba en el BaP como marcador del carácter carcinogénico de esta familia de compuestos. Esta determinación fue establecida por el Comité Científico de los Alimentos (SCF) en el año 2002.

En la [Tabla 9], se presentan las categorías de alimentos que se incluían en el Reglamento (CE) nº 1881/2006 para el control de BaP. También se incluye el contenido máximo de BaP, especificado en cada caso.

Tabla 9. Categoría de alimentos de control de HAPs según Reglamento (CE) nº 1881/2006. Niveles máximos de BaP especificados en µg/kg sobre materia seca (sms).

| Categoría Alimento | Límite BaP (µg/kg sms) |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Aceites y grasas (excluida la manteca de cacao) de consumo directo por humanos o como ingrediente en alimentos | 2,0 |
| Carnes ahumadas o productos derivados | 5,0 |
| Moluscos bivalvos | 10,0 |
| Pescados ahumados y derivados (excepto los moluscos bivalvos) | 5,0 |
| Pescados (no ahumados) | 2,0 |
| Crustáceos y cefalópodos no ahumados | 5,0 |
| Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad | 1,0 |
| Formulaciones para lactantes, incluyendo la leche y derivados | 1,0 |
| Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales (dirigidos específicamente a los lactantes) | 1,0 |

⁴ Fracción PM₁₀ o el material particulado respirable, son partículas de un diámetro menor o igual a 10 micras. Por su tamaño, son capaces de entrar en el sistema respiratorio del ser humano. Mientras menor sea el tamaño de esta partícula, mayor será el potencial daño en la salud. Se destaca una fracción gruesa (partículas de 2,5 a 10 micras) que puede llegar hasta los pulmones, y una fracción fina (menor de 2,5 micras) que puede ingresar hasta los alveolos y luego a la sangre.

El 9 de junio de 2008, la Comisión Técnica Científica de Contaminantes de la Cadena Alimentaria (Comisión CONTAM) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), emitió un dictamen sobre los HAPs en los alimentos. En éste, se llega a la conclusión de que el benzo(a)pireno no es un marcador adecuado de la presencia de HAPs en los alimentos y que un sistema de cuatro HAPs específicos [*benzo(a)pireno (BaP)*, *benzo(a)antraceno (BaA)*, *benzo(b)fluoranteno (BbF)* y *criseno (Cry)*] (HAP4) u ocho [*benzo(a)pireno (BaP)*, *benzo(a)antraceno (BaA)*, *benzo(b)fluoranteno (BbF)*, *criseno (Cry)*, *benzo(k)fluoranteno (BkF)*, *benzo(g,h,i)perileno (BghiP)*, *dibenzo(a,h)antraceno (DiBaH)* y *indeno(1,2,3-cd)pireno (IP)*] (HAP8), serían los indicadores más adecuados. Aunque afirma, que el sistema de ocho HAPs (HAP8) no aporta mucho valor añadido con respecto al sistema de cuatro sustancias (HAP4).

Por esta razón, no puede mantenerse el sistema de valoración del benzo(a)pireno como único marcador del grupo de los HAPs y el 19 de Agosto del 2011 se modifica el Reglamento (CE) nº 1881/2006. Deben introducirse contenidos máximos para otros HAPs y no únicamente para el BaP. Así aparece el Reglamento (CE) nº 835/ 2011.

El **Reglamento (UE) nº 835/2011** de la Comisión de 19 de agosto de 2011, establece referente a los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos que:

- Deben introducirse nuevos contenidos máximos para la suma de las cuatro sustancias (HAP4) propuestas por la EFSA. Este sistema garantiza el control del contenido de HAPs en los alimentos a niveles que no conllevan riesgos para la salud. Además, incluye la posibilidad de controlar también los HAPs en las muestras en las que no puede detectarse el benzo(a)pireno pero que contienen otros HAPs.
- Se mantiene el contenido máximo independiente para el benzo(a)pireno, a fin de garantizar la comparación con los datos anteriores y futuros.
- Por lo que respecta a la suma de los cuatro HAPs (HAP4), deben utilizarse las concentraciones del límite inferior como base para la toma de decisiones sobre conformidad.
- La manteca de cacao presenta contenidos más elevados de HAPs que otros aceites y grasas. Ello es debido, básicamente, a los métodos inadecuados de desecación de los granos de cacao y a que la manteca de cacao, no puede refinarse como otros aceites y grasas vegetales. Por lo tanto, tiene unos contenidos máximos establecidos aparte de los aceites y grasas.
- Los datos ponen de manifiesto que el aceite de coco puede contener más cantidad de HAP4 que otros aceites y grasas vegetales. Ello es debido, a la presencia proporcionalmente más elevada de benzo(a)antraceno y criseno que no puede eliminarse fácilmente durante el refinado del aceite de coco. Los contenidos máximos específicos del aceite de coco deben establecerse, por tanto, a los niveles más reducidos que sean razonablemente posible teniendo en cuenta las posibilidades tecnológicas actuales de los países productores.

En la [Tabla 10] se presentan las categorías de productos alimenticios incluidas en el Reglamento de la UE nº 835/2011. Donde se considera, tanto el contenido máximo de BaP como el de los HAP4 (suma de BaP, BaA, BbF y Cry)

Tabla 10. Resumen del anexo del Reglamento (CE) nº 835/2011, donde se incluyen las categorías de productos alimenticios para los que se especifica un contenido máximo de HAPs, tanto expresado como BaP como suma de HAP4.

| Categoría Alimento | Límite (µg/kg) | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| | BaP | HAP4* (ΣBaP, BaA, BbF, Cry) |
| Aceites y grasas (excluida la manteca de cacao y el aceite de coco) destinados al consumo humano directo o a ser usados como ingrediente de productos alimenticios | 2,0 | 10,0 |
| Granos de cacao y productos derivados | 5,0 µg/kg grasa [1/04/2013-] | 35,0 µg/kg grasa [1/04/2013- 31/3/2015] 30,0 µg/kg grasa [31/3/2015 -] |
| Aceite de coco destinado al consumo humano directo o a ser usado como ingrediente de productos alimenticios | 2,0 | 20,0 |
| Carnes ahumadas y productos cárnicos ahumados | 5,0 [-31/08/2014] | 30,0 [1/09/2012 -31/08/2014] |
| | 2,0 [01/09/2014 -] | 12,0 [01/09/2014 -] |
| Carne de pescado ahumado y productos pesqueros ahumados. En los crustáceos ahumados se aplica a la carne de los apéndices y el abdomen. En el caso de cangrejos ahumados y similares se aplica a la carne de los apéndices | 5,0 [-31/08/2014] | 30,0 [1/09/2012 -31/08/2014] |
| | 2,0 [01/09/2014 -] | 12,0 [01/09/2014 -] |
| Espadines ahumados y en conserva, moluscos bivalvos; carnes y productos cárnicos | 5,0 | 30,0 |
| Moluscos bivalvos (ahumados) | 6,0 | 35,0 |
| Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad | 1,0 | 1,0 |
| Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales (dirigidos específicamente a los lactantes) | 1,0 | 1,0 |

* Las concentraciones del límite inferior se calculan partiendo del supuesto de que todos los valores de las cuatro sustancias por debajo del límite de cuantificación son iguales a cero.

Como se puede observar en la [Tabla 10], las categorías que se presentan son equivalentes a las que se incluían en el Reglamento (CE) nº 1881/2006 [Tabla 9], pero en lugar de incluir únicamente los límites para el BaP también se incluyen los límites para los HAP4.

En cuanto a los límites establecidos para el BaP, son coincidentes en los dos reglamentos excepto para los moluscos bivalvos que disminuye de 10 a 6 µg/kg. Además, en el Reglamento del 2011, se incluyen límites diferentes en función de la fecha pensando en la disminución progresiva de estos contaminantes en los alimentos.

Después de la revisión completa del 2011, este Reglamento se ha modificado dos veces más por lo que respeta al contenido máximo de HAPs, una en el año 2014 y otra en el 2015:

- Reglamento (UE) 1327/2014 de la Comisión, de 12 de diciembre de 2014, por el que se modifica el contenido máximo en HAPs en la carne y los productos cárnicos ahumados del modo tradicional y en pescado y los productos de la pesca ahumados del modo tradicional, a partir del día 1/09/2014 [Tabla 10].

- Reglamento (UE) 2015/1125 de la Comisión, de 10 de julio de 2015, que modifica el Reglamento (CE) nº 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en katsuobushi (bonito seco) y determinados arenques del Báltico ahumados.

Además, de los Reglamentos donde se especifican los niveles de HAPs (BaP) en alimentos, es importante tener en cuenta la Recomendación nº 2005/108/CE relativa a investigaciones complementarias sobre los niveles de HAPs y, el Reglamento (CE) nº 333/2007 por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los niveles de determinados contaminantes (entre los que se incluye el BaP).

En lo que hace referencia a la **Recomendación** de la Comisión de 4 de febrero de 2005, relativa a las investigaciones complementarias sobre los niveles de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en determinados alimento (**2005/108/CE**) recomienda, entre otros aspectos, investigar los niveles respectivos de benzo(a)pireno y, sobre todo, de otros Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP), en particular los señalados como cancerígenos por el Comité científico de la alimentación humana. Así, en forma de anexo, se incluye el listado de los 15 HAPs-SCF [Tabla 1].

El **Reglamento (CE) nº 333/2007**, deroga las directivas 2001/22/CE, 2004/16/CE y 2005/10/CE, donde se establecían los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de plomo, mercurio, cadmio y 3-MCPD, estaño y benzo(a)pireno, respectivamente. Así, incluye para cada contaminante o grupo de contaminantes, los criterios que deben cumplir los métodos de análisis para que puedan ser aplicables para el control oficial de los niveles de los contaminantes indicados en las categorías alimentarias especificadas en el Reglamento (CE) nº 1881/2006.

En la [Tabla 11], se incluye el cuadro 6 del Reglamento (CE) nº 333/2007, que hace referencia a los criterios de aptitud aplicables a los métodos de análisis para el control del benzo(a)pireno.

Tabla 11. Criterios de funcionamiento aplicables a los métodos de análisis para el BaP, según el Reglamento (CE) nº 333/2007 (Cuadro nº6).

| Parámetro | Valor/Comentario |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aplicabilidad | Alimentos especificados en el Reglamento (CE) nº 1881/2006 |
| Límite de detección (LOD) | ≤ 0,3 µg/kg |
| Límite de cuantificación (LOQ) | ≤ 0,9 µg/kg |
| Precisión | CV < 2% (Valores Horrat, según ecuación Horwitz) |
| Recuperación | 50-120% |
| Especificidad | Libre de interferencias de la matriz o del espectro, verificación de detección positiva |
| Incertidumbre estándar (no ampliada) | < Uf o incertidumbre estándar máxima, expresada en unidades de concentración. Donde $Uf = \sqrt{\left(\frac{LOD}{2}\right)^2 + (0,2c)^2}$ donde c es la concentración de interés en µg/kg (**) |

(*) Según ecuación de Horwitz: $CV (\%) = 2^{(1-0,5 \log c)}$, donde C es la concentración en g/mL.

(**) El factor de multiplicación de la concentración es 0,2 porque se considera que en todos los casos la concentración es inferior o igual a 50 µg/kg. Si este valor fuese superior se debería modificar el factor de multiplicación y considerar los valores incluidos en el cuadro 8 del reglamento.

7.3. MÉTODOS OFICIALES PARA EL CONTROL DE LOS HAPs EN EL AIRE AMBIENTE Y EN MATRICES ALIMENTARIAS.

En la [Tabla 12], se incluyen los métodos oficiales de análisis, presentes hasta el momento, en lo que hace referencia a la determinación de HAPs, tanto en el aire ambiente como en matrices alimentarias a nivel general. (Lerda, 2011)

Tabla 12. Métodos oficiales de análisis para la determinación de HAPs tanto en el aire ambiente como en matrices alimentarias.

| Matriz | Método | Año | Comentario |
|---------------|-------------------|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aire ambiente | EN 16362:2006 | 2006 | <i>Ambient air -- Determination of particle-phase polycyclic aromatic hydrocarbons by high performance liquid chromatography</i> |
| | EN 15549:2008 | 2008 | <i>Air Quality-Standard method for the measurement of the concentration of benzo(a)pyrene in ambient air</i> |
| Alimentación | AOAC 973.30 | 1974 | <i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and benzo(a)pyrene in food.</i> |
| | EN ISO 15753:2006 | 2006 | <i>Animal and vegetable fats and oils- Determination of HAP</i> |
| | EN ISO 15302:2007 | 2007 | <i>Animal and vegetable fats and oils- Determination of benzo(a)pyrene- Reverse-phase high performance liquid chromatography method</i> |
| | ISO/CD TR24054 | 2008 | <i>Animal and vegetable fats and oils- Determination of PAH- method using GC/MS</i> |

Como se puede observar en la [Tabla 12], referente a inmisiones atmosféricas, existen dos métodos oficiales publicados. El método del año 2006, que propone la determinación de HAPs de baja volatilidad unidos a partículas, en contraste de la norma ISO 12884 que permite la medida de los HAPs en fase gaseosa. Propone un método de determinación por cromatografía líquida con detector de fluorescencia y *Diode Array* conectados en serie, para la cuantificación e identificación de los compuestos, respectivamente. El método EN 15549:2008, especifica únicamente la determinación del BaP en el aire ambiente, pero es el que está ligado con el control ambiental propuesto tanto en la Directiva 2004/107/EC como en su última actualización (Directiva 2015/1480). En este caso, se describe tanto la parte de captación de muestra (unida a la norma EN 12341) como la determinación de BaP. Ésta se basará en la extracción del analito con disolvente orgánico y posterior análisis por cromatografía líquida con detector de fluorescencia o cromatografía de gases con detector espectrómetro de masas.

En lo que hace referencia a matrices alimentarias, a parte del método AOAC general del año 1974, los métodos oficiales que se presentan sólo están relacionados con análisis de HAPs o BaP en aceites o grasas, tanto vegetales como animales, y en todos los casos la técnica de análisis es la cromatografía, ya sea de gases o de líquidos.

En la presente tesis, los métodos oficiales se comentarán en los capítulos donde se presenten los procedimientos puestos a punto, tanto en el aire ambiente como en matrices alimentarias. Cabe destacar, que en la mayoría de los casos, los procedimientos oficiales son procedimientos abiertos donde la parte de preparación de muestra y análisis suele ser una recomendación. Lo que es interesante de estos procedimientos, son los criterios de calidad exigidos en cada uno de los casos y que servirán de referencia para valorar la adecuación de los procedimientos desarrollados en el presente trabajo.

8. INTERÉS DEL ESTUDIO DE LOS HAPs EN MATRICES AMBIENTALES Y ALIMENTARIAS EN IQS. ANTECEDENTES.

Tal y como se ha indicado en a lo largo de la introducción, los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos son una familia de compuestos de elevado interés debido al aumento de su presencia en el medio ambiente y a sus propiedades como contaminantes orgánicos persistes (POPs). Además, su toxicidad y su posible afectación sobre los seres vivos hacen prioritario su control tanto en el campo ambiental, en especial en el aire ambiente, como en los alimentos que ingerimos.

En la Sección de Cromatografía del IQS, anteriormente ya se había trabajado con esta familia de compuestos. Se había estudiado el contenido de los 16 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos prioritarios para la EPA en fangos de depuradora y productos relacionados, es decir, en matrices ambientales tipo sedimento. En este tipo de matrices, los HAPs son afines por su elevado carácter hidrofóbico y lipofílico. Además, su control en este tipo de matrices está legislado ya que la destinación prioritaria de los fangos de depuradora es la agricultura. Los niveles aceptados en este tipo de matrices son de 6 mg/kg (Σ HAPs: Ace, Fe, Fl, F, Pyr, B(b+j+k)F, BaP, BghiP, IP) y los niveles encontrados en fangos de depuradora oscilan entre 0,01 y 1 mg/kg para cada uno de los compuestos. (Bagó, 2005); (Mejía, 2005)

La presente tesis, surge en el año 2006, con la entrada en vigor de la Directiva 2004/107/CE del Parlamento y del Congreso de la Unión Europea (Real Decreto 812/2007) que realza la importancia del control de los HAPs en el aire ambiente. Por esta razón, y debido a la falta de procedimientos de análisis para esta familia de compuestos en inmisiones, el *Departament de Medi Ambient i Habitatge* de la *Generalitat de Catalunya* (DMAH) propone a IQS el desarrollo y optimización de un procedimiento para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en muestras de aire. A partir de este momento, la Sección de Cromatografía del IQS, cuenta con varios contratos de concesión directa y varios obtenidos a partir de concurso público, relacionados con el análisis de HAPs en muestras de inmisiones captadas en diferentes poblaciones del territorio catalán.

Los contratos de concesión directa se basan en el estudio de un procedimiento para la determinación de HAPs en el aire ambiente: uno en el año 2006 (Expediente 912/2006 de 7 de Septiembre), otro en el 2007 (Expediente 316/2007 del 10 de Abril) y el último, en el 2008 (Expediente 326/2008 del 11 de Mayo).

El primer contrato obtenido a partir de concurso público fue adjudicado al IQS en julio de 2008 con una duración de un año y medio, prorrogado a tres años (diciembre 2010), para la Realización del análisis de muestras manuales obtenidas de los sensores integrados en la *Xarxa de Vigilància i Previsió de la Contaminació Atmosfèrica de Catalunya*. Entre otros contaminantes, se incluye la determinación de HAPs en aproximadamente 350 muestras anuales captadas en 14 estaciones distribuidas por toda Cataluña. Se destacan estaciones tanto correspondientes a áreas de fondo o de zonas rurales y de zonas urbanas tanto de tráfico como industriales.

El segundo contrato conseguido a partir de concurso público, fue adjudicado a IQS en enero de 2011, con duración de un año y medio no prorrogable. En este caso, el concurso público era equivalente al anterior pero con un aumento en el número de muestras. En realidad se han realizado unas 1000 muestras, igual que el anterior contrato, pero en la mitad de tiempo (Expediente PTOP_2011_3534; *Realització de l'anàlisi de les mostres manuals obtingudes pels sensors integrats a la Xarxa de Vigilància i Previsió de la Contaminació Atmosfèrica de Catalunya propietat del Departament de Territori i Sostenibilitat*).

El conjunto de contratos tanto de concesión directa como a través de concursos públicos han permitido desarrollar el procedimiento para la determinación de HAPs en muestras de inmisiones atmosféricas, dentro de un entorno de calidad acreditado por ENAC según la Norma ISO 17025:2005⁵. Además, el volumen de muestras analizadas ha permitido disponer de suficientes datos como para poder estudiar los resultados obtenidos, teniendo en cuenta, tanto factores ambientales estacionales como posibles fuentes emisoras de los contaminantes [*Objetivo II, de la presente tesis*].

A partir de la experiencia adquirida en el análisis de HAPs en inmisiones ambientales y considerando las demandas externas por parte de diferentes empresas solicitando la determinación de este tipo de compuestos en matrices alimentarias (aceites y vinos), a IQS le ha parecido interesante continuar en esta línea de investigación dentro del marco de la presente tesis. Se ha trabajado con dos matrices alimentarias: la leche y el café. Ambas se caracterizan por tener un contenido lipídico importante. Su elección se ha realizado teniendo en cuenta el diferente origen de contaminación que se vinculan con ambas matrices. La leche, producida por el animal, se contamina por HAPs fundamentalmente a través de una contaminación atmosférica. Sin embargo, en el café en grano, la contaminación por HAPs viene vinculada fundamentalmente a su procesado [*Objetivo IV, de la presente tesis*].

Para poder llevar a cabo tanto el análisis en muestras de aire ambiente como en las diferentes matrices alimentarias, se ha considerado necesario realizar un estudio exhaustivo de los métodos cromatográficos que permitan analizar tanto los 16 EPA-HAPs (requeridos a nivel ambiental) como los 15 SCF-HAPs (de interés en el campo alimentario). Se ha trabajado con las diferentes técnicas cromatográficas disponibles en la Sección tanto a nivel de separación como de equipo, con la finalidad de comparar métodos de separación en lo que hace referencia a selectividad, productividad, consumos y parámetros de calidad. [*Objetivo I, de la presente tesis*]

Además, teniendo en cuenta el gran número de compuestos que componen la familia de los HAPs como contaminantes, resulta muy interesante poder conocer cuál es el mecanismo de separación que rige la elución de los HAPs en los métodos cromatográficos propuestos con la finalidad de poder predecir los tiempos de retención de otros compuestos de la misma familia que puedan resultar de interés y que no hayan sido incluidos directamente en la presente tesis. Es por esta razón que se decide trabajar con las metodologías QSRR. Se propone establecer un modelo de predicción de tiempos de retención que permita poder ampliar el grupo de HAPs a estudio [*Objetivo II, de la presente tesis*].

⁵ Norma ISO 17025:2005 referente a los requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

*OBJETIVOS

Debido a la importancia del estudio de la familia de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos y de su control prioritario tanto en el aire ambiente como en los alimentos, los objetivos que se plantean en la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

- I. **Desarrollar métodos analíticos** basados en las técnicas cromatográficas disponibles en la Sección de Cromatografía del IQS (HPLC-FLU, HRGC-MS y UHPLC-FLU) para la determinación de 24 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos entre los que se incluyen los compuestos tanto de análisis prioritarios en el campo ambiental (EPA y ATDRR) como alimentario (SCF).
- II. **Establecer un modelo de predicción basado en las metodologías QSRR** que describa el mecanismo de separación de la familia de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos por cromatografía líquida, con la finalidad de poder ampliar el grupo de compuestos a determinar de esta familia de contaminantes. Además, se propone **estudiar la robustez del modelo de predicción**.
- III. **Desarrollar un procedimiento para determinar Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en el aire ambiente** a partir de la fracción PM10 del material particulado, para el cumplimiento del Real Decreto 102/2011. **Validar y acreditar** dicho procedimiento según la norma ISO 17025:2005. Finalmente, **aplicarlo al análisis de las muestras obtenidas de las diferentes estaciones de la Xarxa de Vigilancia i Previsió de la Contaminació (XVPC) correspondientes al Departament de Medi Ambiente i Habitatge (DMAH) de la Generalitat de Catalunya**.
- IV. **Desarrollar procedimientos para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en dos matrices alimentarias: leches crudas** tanto de vaca como de oveja y **café en grano** tanto verde como tostado. En todos los casos, se debe optimizar el procedimiento de preparación de la muestra, estudiar diferentes parámetros de calidad para valorar el procedimiento de análisis y finalmente, aplicarlo al análisis de muestras de diferentes orígenes.

Cada uno de estos objetivos se desarrolla en los diferentes capítulos de la presente tesis.

*CAPITULO I. DESARROLLO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Las dos técnicas analíticas más utilizadas y propuestas en los métodos oficiales para la determinación de HAPs tanto en el aire ambiente como en matrices alimentarias, son la cromatografía líquida con detector de fluorescencia (HPLC-FLU) y la cromatografía de gases con detector espectrómetro de masas con ionización por impacto electrónico (HRGC-MS/EI).

Ambas técnicas, utilizan detectores que parecen ser suficientemente sensibles como para determinar las bajas concentraciones exigidas para los HAPs tanto en inmisiones como en matrices alimentarias. En lo que hace referencia al detector propuesto para cromatografía líquida, el detector de fluorescencia, es un detector muy selectivo para este tipo de compuestos, ya que aprovecha el carácter fluorescente de la mayoría de los HAPs. Sin embargo, el principal problema que presenta, es la difícil confirmación de los compuestos identificados por tiempos de retención, ya que, a pesar de su elevada selectividad, el efecto matriz y la gran cantidad de HAPs que forman parte de esta familia, puede ser un problema. El detector espectrómetro de masas también es un detector que permite llegar a límites de detección bajos, especialmente cuando se trabaja en su modo SIM (*Selected Ion Monitoring*) y, además, a diferencia del detector de fluorescencia, permite la confirmación de los picos identificados a partir de su espectro de masas (o las relaciones masa/carga de los iones característicos seleccionados para la cuantificación).

El principal problema que presenta la cromatografía de gases frente a la cromatografía líquida en la determinación de los HAPs, es que la mayoría de los compuestos de esta familia son semivolátiles y, por lo tanto, se deben tomar precauciones para que no condensen antes de que lleguen al detector.

Otro de los problemas que se presentan cuando se optimizan métodos cromatográficos con los compuestos de la familia de los HAPs, es que algunos de ellos son isómeros, por lo que su separación, tanto por HPLC como por HRGC, puede ser complicada. Por esta razón, la elección de la columna es uno de los puntos clave a considerar en función de los HAPs que se quieran determinar.

Además, debido a la diversidad de HAPs que se quieran separar, los cromatogramas obtenidos pueden ser largos, así la aplicación de las técnicas ultrarrápidas, tanto de cromatografía líquida como de gases será, una alternativa a tener en cuenta.

Así, en la presente Tesis se desarrollarán tres métodos cromatográficos para la determinación de los HAPs: uno por cromatografía líquida con detector de fluorescencia (Método 1: HPLC-FLU), otro por cromatografía de gases con detector espectrómetro de masas con impacto electrónico en modo SIM (Método 2: HRGC-MS/EI-SIM). Y con el objetivo de reducir al máximo el tiempo de análisis y aumentar la productividad en la determinación por cromatografía líquida, se propone realizar una transferencia de HPLC a UHPLC (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*) aprovechando la instrumentación disponible en la Sección (Método 3: UHPLC-FLU).

Para cada procedimiento, se optimizará el método cromatográfico para aplicarlo a los 16 EPA-HAPs junto con el benzo(j)fluoranteno y, posteriormente, se realizará una ampliación para poder incluir también los compuestos de interés alimentario, propuestos por la SCF, que no son comunes con los de la EPA, es decir, benzo(e)pireno, 5-metilcriseno, ciclopenta(cd)pireno, y los cuatro isómeros del dibenzopireno (DiBaeP, DiBahP, DiBaiP y DiBalP). Se optimizarán tanto las condiciones de separación como las condiciones de detección de los 24 compuestos a estudio.

Con los métodos de separación propuestos, se valorarán parámetros de calidad que permitirán conocer su posible aplicación en la determinación de estos compuestos en las diferentes matrices a estudio. Así, se estudiará, en cada uno de los casos y para cada compuesto, su selectividad (únicamente desde el punto de vista de la resolución entre los patrones de HAPs disponibles), un posible rango lineal (que podrá relacionarse con los rangos de trabajo en su aplicación a muestras) y sus límites de detección y cuantificación con patrones (que dará una idea de cuáles pueden ser los límites inferiores de trabajo).

Además, se realizará una comparativa entre los métodos cromatográficos puestos a punto en términos tanto de calidad como de productividad y funcionalidad en el laboratorio.

1. PATRONES DE TRABAJO.

En la presente Tesis, tanto en la parte de desarrollo de métodos cromatográficos como para las posteriores aplicaciones al análisis de muestras, se han adquirido tanto estándares individuales (habitualmente sólidos) como disoluciones concentradas conjuntas, todas proporcionadas por la empresa *Dr. Ehrenstorfer*.

Trabajar con disoluciones conjuntas en lugar de con los sólidos individuales, permite que el coste de los patrones sea menor. Sin embargo, la concentración máxima de trabajo la limita la concentración de la disolución y, además, su correcta conservación es indispensable para poder asegurar la concentración proporcionada por el fabricante, a lo largo de su tiempo de uso.

Los patrones sólidos se han utilizado tanto en aquellos casos en los que no había otra posibilidad o, como control de la concentración de este determinado compuesto en una disolución conjunta.

Trabajar con disoluciones conjuntas tiene la ventaja que, como incluye varios de los compuestos de interés, simplifica la preparación de las diluciones de trabajo. Por el contrario, estas disoluciones tienen los mismos inconvenientes que los patrones en disolución, pero además, se añade el problema de que no es posible la identificación individual de los compuestos incluidos en la mezcla.

Así, en función de su uso, se utilizará uno u otro de los patrones adquiridos.

1.1. PATRONES COMERCIALES.

Los patrones comerciales utilizados en la presente tesis son los siguientes:

Disoluciones conjuntas:

- Disolución **PAH MIX 9 (US EPA 16)** de 100 ng/μL en acetonitrilo (referencia: X20950009AL para el envase de 10 mL y XA2950009AL para el envase de 1 mL).
Esta disolución incluye los 16 HAPs prioritarios para la EPA disueltos en acetonitrilo. Incluye naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno benzo(a)pireno, dibenzo(ah)antraceno, benzo(ghi)perileno e indeno(123-cd)pireno.
- Disolución **PAH MIX 525** de 100 ng/μL en acetona (referencia: XA05250100AC para el envase de 1 mL).
Esta disolución incluye 13 de los HAPs prioritarios para la EPA disueltos en acetona. De los 16 HAPs incluidos en la disolución PAH MIX 9, no incluye ni el naftaleno, ni el fluoranteno, ni el acenafteno.
Este estándar se utiliza para preparar las disoluciones control tanto de preparación como de estabilidad cuando se trabaja con los HAPs más pesados (> BaA).
- Disolución **PAH MIX 170** de 10 ng/μL en acetonitrilo (referencia: L20950170AL para el envase de 10 mL).
Esta disolución incluye los 15 HAPs prioritarios para la SCF incluidos en la Recomendación 2005/108/EC, de interés en el campo alimentario. Esta disolución es importante porque incluye el ciclopenta(cd)pireno, 5-metilcriseno y los cuatro isómeros del dibenzopireno, además del benzo(j)fluoranteno. También incluye 8 HAPs que ya estaban presentes en el patrón conjunto PAH MIX 9: benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno benzo(a)pireno, dibenzo(ah)antraceno, benzo(ghi)perileno e indeno(123-cd)pireno.

Las disoluciones conjuntas de HAPs que se han utilizado en esta tesis, están preparadas en acetonitrilo o en acetona. Se descarta utilizar patrones preparados en metanol ya que, su elevada volatilidad hace que la disolución, una vez abierta, sea de difícil conservación.

Disolución conjunta de HAPs deuterados:

Esta disolución se utilizará como patrón interno sólo cuando se trabaje con cromatografía de gases.

- Disolución **PAH MIX 77** de 10 ng/μL en tolueno (referencia: LA20950077TO para el envase de 1 mL).
Esta disolución contiene sólo tres de los 16 EPA-HAPs, pero éstos están totalmente deuterados, es decir, todos sus hidrógenos han sido substituidos por deuterios, aumentando su masa molecular en tantas unidades como deuterios tenga respecto al HAP no deuterado. Incluye: acenaftileno D8, benzo(a)pireno D12 y pireno D10.
Se ha escogido esta disolución, ya que, es más económica que la disolución que incluye los 16 EPA-HAPs deuterados y además, incluye una representación de compuestos de diferente volatilidad e incluye el BaP deuterado (compuesto escogido en la mayoría de los casos como marcador de toxicidad global). Así, incluye un compuesto con tres anillos fusionados (acenaftileno), otro de cuatro (pireno) y otro de cinco anillos fusionados (BaP).

Estándares individuales:

- Dibenzo(a,i)pireno 10 ng/μL en acetonitrilo (referencia: L20720000AL para el envase de 10 mL). Compuesto sólo disponible en disolución.
- Benzo(j)fluoranteno, sólido (referencia C20575000)
- Benzo(a)antraceno, sólido (referencia:C20545000)
- Benzo(a)pireno, sólido (referencia: C20635000)
- Dibenzo(a,e)pireno, sólido (referencia: C20715000)
- Dibenzo(a,h)pireno, sólido (referencia: E20717000)
- Dibenzo(a,l)pireno, sólido (referencia: E20725000)

El patrón de B_jF se ha utilizado en las primeras etapas de desarrollo de métodos cromatográficos cuando sólo interesa la separación de los 16 EPA-HAPs y el B_jF, compuestos relacionados con el ámbito ambiental o control de aire en inmisiones.

Los patrones de BaA y BaP, se han utilizado simplemente para el control de estos compuestos en la disolución conjunta.

Los patrones de dibenzopirenos se han utilizado para la identificación de los compuestos individuales en su optimización de la separación.

1.2. DISOLUCIONES.

Las disoluciones se han preparado combinando los diferentes patrones disponibles para obtener disoluciones conjuntas de las concentraciones de interés con los compuestos a estudio en cada caso. Igualmente, a lo largo de la presente tesis, se indicarán los patrones conjuntos utilizados y su concentración.

El disolvente de las disoluciones varía en función de si se trabaja con cromatografía líquida o de gases. Cuando los patrones se inyectan en los equipos de cromatografía líquida se preparan utilizando acetonitrilo como disolvente, mientras que cuando se inyectan en el cromatógrafo de gases se preparan en acetona o en tolueno, según convenga.

1.3. CONSERVACIÓN, CONTROL Y CADUCIDAD DE LAS DISOLUCIONES PREPARADAS.

Tanto las disoluciones compradas como las preparadas deben conservarse en el congelador (temperatura inferior a -18°C), bien tapadas y protegidas de la luz, para evitar la fotodegradación de los HAPs.

Durante el desarrollo de la presente tesis, se ha comprobado la estabilidad de las disoluciones preparadas. Cabe destacar que, tanto en el caso de trabajar con cromatografía líquida como de gases, las diluciones conservadas pueden llegar a concentraciones de las décimas del nanogramo por mililitro, por eso, su control para asegurar las concentraciones es importante.

De forma continua, se realiza el control de peso antes y después de utilizar las disoluciones de trabajo (tanto las disoluciones compradas como las preparadas), para garantizar que no se han producido pérdidas por la evaporación del disolvente y, en consecuencia, cambios no deseados de la concentración de los patrones a utilizar.

Además, cuando se trabaja con fines cuantitativos este control se considera insuficiente. En esta tesis, se ha decidido realizar un control de la preparación y un control de estabilidad de los analitos:

- Control de preparación

Cuando se preparan los patrones de trabajo, siempre se realizan dos series de diluciones independientes, una completa que incluye todas las diluciones de calibración y otra, donde sólo se realizará una dilución control, de concentración equivalente a una de las diluciones de calibración. Se compararán los factores de respuesta de las dos diluciones equivalentes, para cada uno de los HAPs de interés. Se aceptan diferencias de $\pm 10\%$. Una variación del 10% parece demasiado amplia, pero hay que tener en cuenta que hay ocasiones en que las disoluciones control se preparan por pesada a partir del estándar

sólido. En estas ocasiones, la cantidad pesada es cercana a los 5,00 mg por lo que su incertidumbre es elevada.

Cabe destacar, que para los métodos no acreditados, la disolución control se podrá preparar a partir de la misma disolución estándar concentrada, mientras que si el método está acreditado, las disoluciones madre deben tener diferente procedencia.

- Control de estabilidad de los HAPs en la disolución preparada

Una vez asegurada la correcta preparación de las disoluciones patrón, estas se conservarán en el congelador ($T < -20^{\circ}\text{C}$), y se utilizarán en diferentes ocasiones antes de su fecha de caducidad. Para controlar que los patrones continúan siendo estables dentro de la mezcla y se mantiene su concentración individual, se propone calcular la estabilidad en la disolución (Estabilidad HAP_i (%)). Para ello, se calcula la relación entre los factores de respuesta relativos al BaP un día determinado, respecto a los que se obtuvo en la disolución recién preparada.

En la [Ecuación 1], se incluye la fórmula que se utiliza para calcular la Estabilidad del HAP_i en la disolución preparada (%).

$$\text{Estabilidad HAP}_i \text{ disolución (\%)} = \frac{(\text{FRR}_i)_{\text{día:X}}}{(\text{FRR}_i)_{\text{día:0}}} \cdot 100 = \frac{\left(\frac{\text{Fr}_i}{\text{Fr}_{\text{BaP}}}\right)_{\text{día:X}}}{\left(\frac{\text{Fr}_i}{\text{Fr}_{\text{BaP}}}\right)_{\text{día:0}}} \cdot 100$$

Ecuación 1. Estabilidad del HAP_i en la disolución preparada.

Donde:

FRR_i es el factor de respuesta relativo del HAP "i", respecto al BaP

Fr_i es el factor de respuesta (concentración/área) de un determinado HAP "i"

Fr_{BaP} es el factor de respuesta (concentración/área) del BaP

Día x: es el día que se inyecta la disolución preparada posterior al día de preparación de los patrones

Día 0: corresponde al día de preparación de los patrones.

En el caso de que se tuviera un problema por concentración del disolvente de la disolución, no se detectaría con este cálculo, por eso, es imprescindible controlar por pesada las disoluciones antes de inyectarlas.

Por otro lado, si el problema se tuviera sólo con el BaP, los porcentajes de estabilidad obtenidos para todos los compuestos serían equivalentes.

Normalmente, se suele observar un aumento del parámetro de Estabilidad del HAP en la disolución, a medida que transcurren los días de conservación, es decir, el área del HAP_i disminuye progresivamente.

El control de los factores de respuesta relativos de cada uno de los HAPs de las disoluciones de interés en la disolución recién preparada resulta también interesante, ya que si se consigue un histórico, se pueden también detectar problemas de concentración en la disolución comprada. En el Capítulo III de la presente tesis, se presentarán los factores de respuesta relativos de BaA, BbF, BkF, BjF, DiBahA, BghiP e IP en el procedimiento acreditado para la determinación de HAPs en inmisiones.

Aprovechando el cálculo indicado para la estabilidad de los HAPs en la disolución preparada, ha sido posible estimar una caducidad para los patrones preparados. El estudio se ha realizado con un patrón de 80 ng/mL de cada uno de los 16 EPA-HAPs, preparado en acetonitrilo, a partir de la disolución PAH MIX 9. Se ha analizado a lo largo de un mes, en diferentes sesiones de trabajo.

En la [Figura 5], se presenta el gráfico de control del parámetro de Estabilidad de BaA, BbF, BkF, BjF, DiBahA, BghiP e IP en la disolución preparada transcurridos diferentes días. El máximo se ha establecido en 35 días. En el gráfico, también se incluyen los límites inferior y superior de especificación (LIE y LSE, respectivamente), que se han fijado en 90-110%.

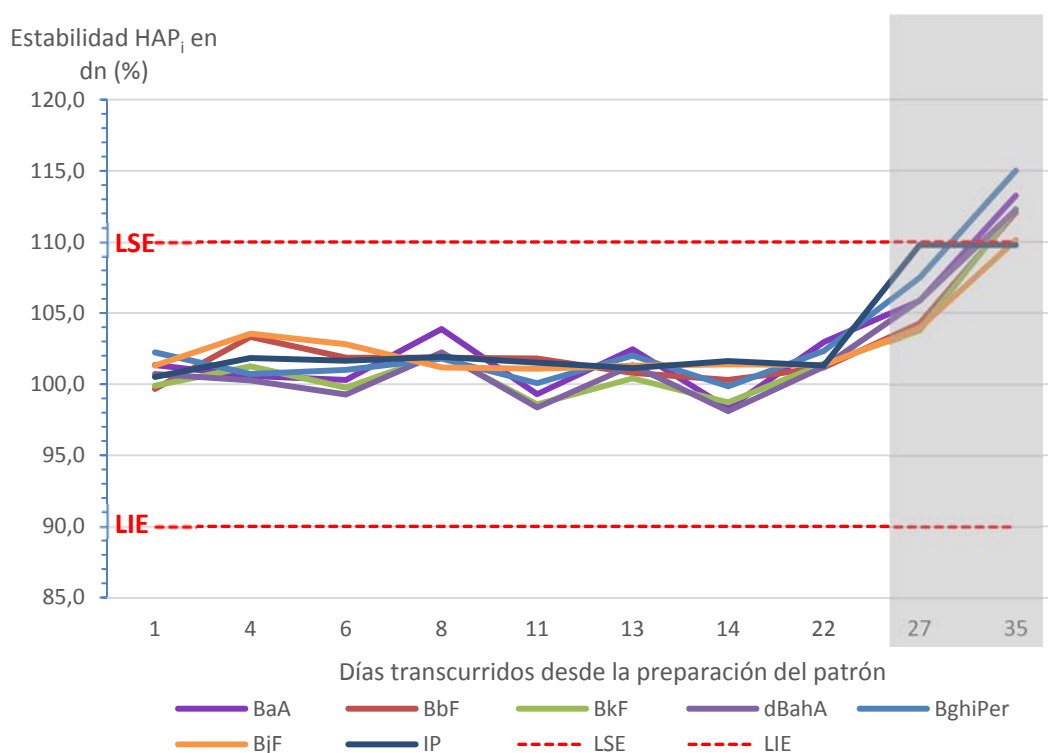


Figura 5. Gráfico de control del parámetro de Estabilidad de los HAPs en la disolución preparada (%) transcurridos hasta 35 días desde la preparación de un patrón de 80 ng/mL. Las líneas rojas punteadas representan los límites inferior y superior de especificación (LIE y LSE).

Como se puede observar, entre los 27 y los 35 días la mayoría de los compuestos representados tienen un valor para el parámetro de Estabilidad superior o igual al 110 %. Por lo que se fija la caducidad de las disoluciones de HAPs en 1 mes.

2. MÉTODO 1: HPLC-FLU.

Como se ha comentado, la cromatografía líquida con detector de fluorescencia es una de las técnicas más utilizadas para el análisis cromatográfico de los HAPs y es una de las técnicas propuestas en los métodos oficiales. En esta tesis, se ha llevado a cabo la optimización para el análisis de 24 HAPs por HPLC-FLU. En una primera etapa se trabajará con los 16 EPA-HAPs (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(ah)antraceno, benzo(ghi)perileno e indeno(123-cd)pireno) con el benzo(j)fluoranteno y, posteriormente, se incluirá el benzo(e)pireno, ciclopenta(cd)pireno, 5-metilcriseno y los cuatro isómeros del dibenzopireno.

Como se puede observar, entre los compuestos a separar hay algunos que son isómeros, así que la elección de la columna es un punto importante para poder asegurar su separación. Bibliográficamente, para la separación de HAPs se utilizan columnas de fase inversa tipo C18, tanto de tipo monomérico como polimérico. Hasta el momento, tal y como se ha comentado en la introducción, la Sección de Cromatografía ya había trabajado en la separación de los 16 EPA-HAPs, así que las columnas utilizadas servirán como punto de partida para la posterior optimización del método de separación global.

Una de las columnas que se han utilizado en la Sección para la separación de los HAPs es una Zorbax SB-C₁₈ (250 X 4,6 mm, 5 µm), de *Agilent Technologies* (Mejía, 2005). Ésta es una columna de fase estacionaria monomérica de base sílica de alta pureza funcionalizada con grupos C18 (fase inversa). En este caso, la columna tiene la propiedad *stablebond (SB)*, es decir, que los grupos silanoles están protegidos estéricamente por dos grupos isobutilo de los ataques hidrolíticos, dándole una elevada estabilidad a pH bajos. (Scientific, 2013)

En esta columna se ha trabajado en la separación de los 16 EPA-HAPs y no se han obtenido resultados satisfactorios en lo que hace referencia a la separación de las parejas de isómeros: Ace-FI, BaA-Cry y BbF-BkF. (Bagó, 2005)

La segunda columna propuesta es una *Waters PAH* (250 X 3 mm, 5 µm) de *Waters Cromatografía*. Ésta es una columna con fase estacionaria polimérica, específica para el análisis de HAPs [Figura 6]. Con esta columna, se consigue separar satisfactoriamente las tres parejas críticas de compuestos. (Bagó, 2005)

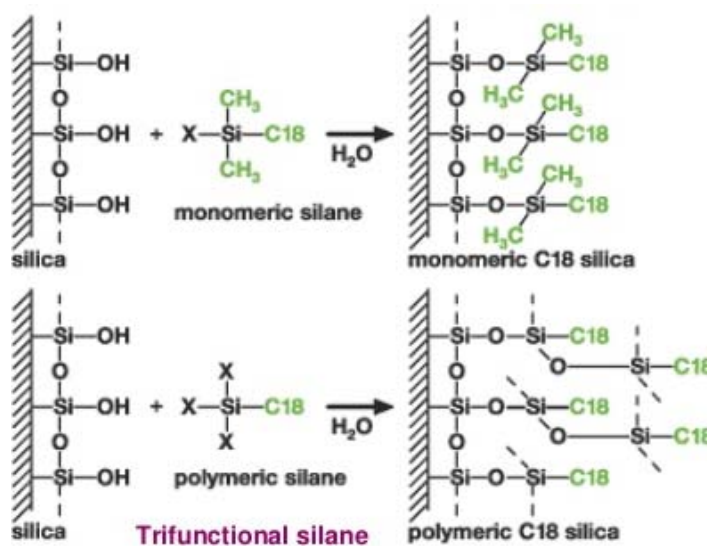


Figura 6. Representación de las diferencias entre la estructura de las fases estacionarias en base sílice de tipo monomérico y polimérico, respectivamente.

Como se puede observar en la [Figura 6], cuando la fase estacionaria se prepara a partir de un reactivo tipo alquil-silano monofuncional (normalmente, cloro alquil silano). Éste sólo puede formar un enlace simple con un grupo silanol de la superficie, obteniéndose una fase ligada monomérica. Sin embargo, cuando se utiliza un reactivo alquil-silano di o tri-funcional, el reactivo, potencialmente, puede unirse a la superficie de la sílice con uno, dos o tres enlaces y, a su vez, las moléculas de reactivo también pueden reaccionar con otras moléculas de reactivo. Así, la estructura resultante se asemeja a una red tridimensional que corresponde a la fase estacionaria de tipo polimérico. El principal problema que presenta este tipo de fases, es que es difícil controlar la capa de polímero formada provocando una posible falta de reproducibilidad entre los diferentes lotes de la misma columna. Sin embargo, su principal ventaja es que presentan una mayor selectividad estérica para moléculas como los HAPs. Así, que han sido aceptadas para este tipo de aplicaciones específicas. (Tosoh Bioscience LLC: The Chemistry of Innovation. Technical suport, s.f.)

En lo que refiere a las dimensiones, ambas columnas utilizadas hasta el momento son convencionales y muy parecidas (250 mm longitud y 5 µm de tamaño de partícula). Sólo difieren en su diámetro interno, siendo menor el de la columna polimérica (3,0 por 4,6 mm). Sin embargo, los cromatogramas obtenidos, en los dos casos, son largos y de aproximadamente 30 min.

En esta tesis, para la separación de los HAPs, se propone trabajar con una columna Pursuit 3 PAH (100 X 4,6 mm, 3 µm) de *Agilent Technologies*. En lo que hace referencia a su fase estacionaria, es polimérica de sílice funcionalizada con grupos C18, equivalente a la *Waters PAH*. Se caracteriza por tener un tamaño de poro grande (200 Å) y una elevada densidad de ligando que la hacen especialmente indicada para trabajar con esta familia de compuestos. En este caso,

la columna tiene una longitud menor que las utilizadas anteriormente (100 mm), por lo que se perdería capacidad global de separación, pero por el contrario, tiene un menor tamaño de partícula (se ha disminuido de 5 a 3 μm). La disminución del tamaño de partícula permite un aumento de la eficacia, ofreciendo la posibilidad de aumentar la resolución entre picos y aumentar la velocidad de separación. Sin embargo, como punto negativo se puede decir que se requerirá una mayor presión de trabajo.

Para la optimización de los métodos cromatográficos por HPLC-FLU, se ha trabajado principalmente con un cromatógrafo Alliance 2690 y con detector de fluorescencia de longitud de onda variable modelo 2475, ambos de *Waters*. Para la adquisición de los datos, y para el tratamiento de la información, se ha trabajado con el software de *Waters, Empower* en sus versiones 2.0 y 3.0. Además, para poder optimizar mejor la separación de los compuestos nuevos, se ha trabajado también con un equipo de HPLC con detector de *Diode Array* de *Agilent Technologies (Agilent 1200)*, con sistema de adquisición y tratamiento de datos tipo *Chemstation*. Aunque los límites de detección con un detector de *Diode Array* son más elevados que cuando se trabaja con el detector de fluorescencia, es posible seguir todos los compuestos con una misma longitud de onda.

2.1. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE DETECCIÓN POR FLUORESCENCIA.

Para poder llevar a cabo la detección por fluorescencia es necesario conocer las longitudes de onda de excitación y emisión características de cada uno de los compuestos a estudio.

En la [Tabla 13], se incluyen las parejas de longitudes de onda (excitación/emisión) propuestas para la detección de los 16 EPA-HAPs y que se han utilizado hasta el momento en la Sección de Cromatografía. Como se puede observar, el acenaftileno no presenta fluorescencia por lo que no se podrá seguir con este detector. En el caso de querer determinarlo, se debería detectar por ultravioleta pero perdiendo sensibilidad.

Tabla 13. Longitudes de onda de excitación y emisión para la determinación de los 16 EPA-HAPs, utilizadas hasta el momento en la Sección de Cromatografía. (Bagó, 2005), (Mejía, 2005)

| $\lambda_{\text{excitación}}/\lambda_{\text{emisión}}$ | Compuesto (HAP) |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| 280/340 | Na, Ace, Fl |
| No fluorescente | Acy |
| 250/376 | Fe, An |
| 285/460 | Pa |
| 333/390 | Pyr |
| 296/405 | BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP |
| 305/500 | IP |

Teniendo en cuenta que en las matrices de estudio de esta tesis (tanto en inmisiones ambientales como en las de tipo alimentario), los HAPs de interés son los más pesados (BaA, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP e IP), se propone realizar un estudio exhaustivo de sus espectros de excitación y emisión. De esta manera, será posible escoger mejor las longitudes de onda de

trabajo en el caso de tener problemas de selectividad cuando se trabaje con los diferentes tipos de muestra.

El estudio de longitudes de onda también se realizará de todos aquellos compuestos de la familia de los HAPs con los que no se ha trabajado anteriormente en la Sección, es decir, benzo(j)fluoranteno, benzo(e)pireno, ciclopenta(cd)pireno, 5-metilcriseno y los cuatro isómeros del dibenzopireno.

El estudio de los espectros de excitación y emisión, se realiza aprovechando la función 3D que incluye el software de *Empower*. Así, se fija una longitud de onda de excitación y se hace un barrido de emisión en el rango de longitudes de onda escogido. Posteriormente, se fija la longitud de onda de máxima emisión hallada y se hace un barrido de las longitudes de onda de excitación. De esta manera, se consigue obtener el espectro de excitación y emisión de cada compuesto.

En la [Tabla 14], se incluyen algunas de las parejas de longitudes de onda halladas bibliográficamente, y que pueden servir como punto de partida para realizar el estudio espectral.

Tabla 14. Longitudes de onda de excitación y emisión bibliográficas de los HAPs a estudio.

| Compuesto (HAP) | $\lambda_{\text{excitación}}/\lambda_{\text{emisión}}^{(*)}$ | |
|----------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| | IQS | Bibliográfico |
| Benzo(a)antraceno | 296/405 | 260/420 (1) - 265/400 (2) - 265/380 (4) |
| Benzo(b)fluoranteno | 296/405 | 290/410 (2) - 290/440 (4) |
| Benzo(k)fluoranteno | 296/405 | 290/430 (1) - 290/410 (2) - 290/440 (4) |
| Benzo(a)pireno | 296/405 | 290/430 (1) - 290/410 (2) - 290/440 (4) |
| Dibenzo(ah)antraceno | 296/405 | 290/430 (1) - 293/485 (4) |
| Benzo(ghi)perileno | 296/405 | 290/430 (1) - 293/485 (4) |
| Indeno(123-cd)pireno | 305/500 | 250/500 (1) - 250/485 (2) |
| Benzo(j)fluoranteno | --- | 240/505 (4) |
| Benzo(e)pireno | --- | 290/410 (2) |
| ciclopenta(cd)pireno | --- | No fluorescente (4) |
| 5-metilcriseno | --- | 265/380 (4) |
| Dibenzo(a,e)pireno | --- | 310/396 (3) - 280/404 (4) |
| Dibenzo(a,h)pireno | --- | 316/449 (3) - 260/456 (4) |
| Dibenzo(a,i)pireno | --- | 304/432 (3) - 292/440 (4) |
| Dibenzo(a,l)pireno | --- | 323/418 (3) - 293/485 (4) |

(*) Todas las parejas de longitudes de onda se determinan utilizan como disolvente acetonitrilo/agua (1) (UNE16362, 2006); (2) (MTA/MA-039/A00); (3) (Wilson, 2014); (4) (ASPCAT, Agilent, & UB, 2012)

Como se puede observar, la bibliografía muestra una gran variedad de parejas de longitudes de onda para la determinación de los diferentes HAPs. En la [Tabla 14] sólo se muestra una pequeña representación. Por esta razón, disponer de los espectros de excitación y emisión de los compuestos a estudio tiene su interés, de cara a poder seleccionar mejor las longitudes de onda de trabajo. Cabe destacar, la no fluorescencia del ciclopenta(cd)pireno igual que sucedía con el acenaftileno. Si se considera la estructura de los dos compuestos no fluorescentes de los 24 a determinar, queda claro que, la presencia de un anillo de cinco carbonos insaturado situado en posición externa y unido a dos anillos bencénicos fusionados, hace perder la fluorescencia del compuesto. Esto no sucede ni en el caso del acenafteno ni para el fluoreno, fluorantenos o indeno(123-cd)pireno, ya que, aunque en estos casos existe un anillo de cinco carbonos en su

estructura, en el caso del acenafteno éste no se encuentra insaturado, y en el del fluoreno o fluorantenos se encuentra entre los dos anillos bencénicos (ambos no fusionados entre sí).

Para el estudio de los espectros del BaA, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP e IP, se prepara una disolución 200 ng/mL en acetonitrilo a partir de la disolución madre PAH MIX 9 y se inyecta en condiciones de 80:20 acetonitrilo/agua MilliQ. Mientras que para el estudio espectral de los otros HAPs, se inyectan disoluciones individuales de 100 mg/L o 10 mg/L (en función del patrón madre disponible, ver página 42). En este caso, se propone trabajar en modo isocrático (100% ACN) para que los compuestos más pesados se eluyan lo antes posible.

En la [Tabla 15] y la [Tabla 16], se incluyen las condiciones de detección de los métodos ensayados para el estudio de los espectros de emisión y excitación, respectivamente.

Tabla 15. Condiciones de detección de los métodos ensayados para estudiar los espectros de emisión

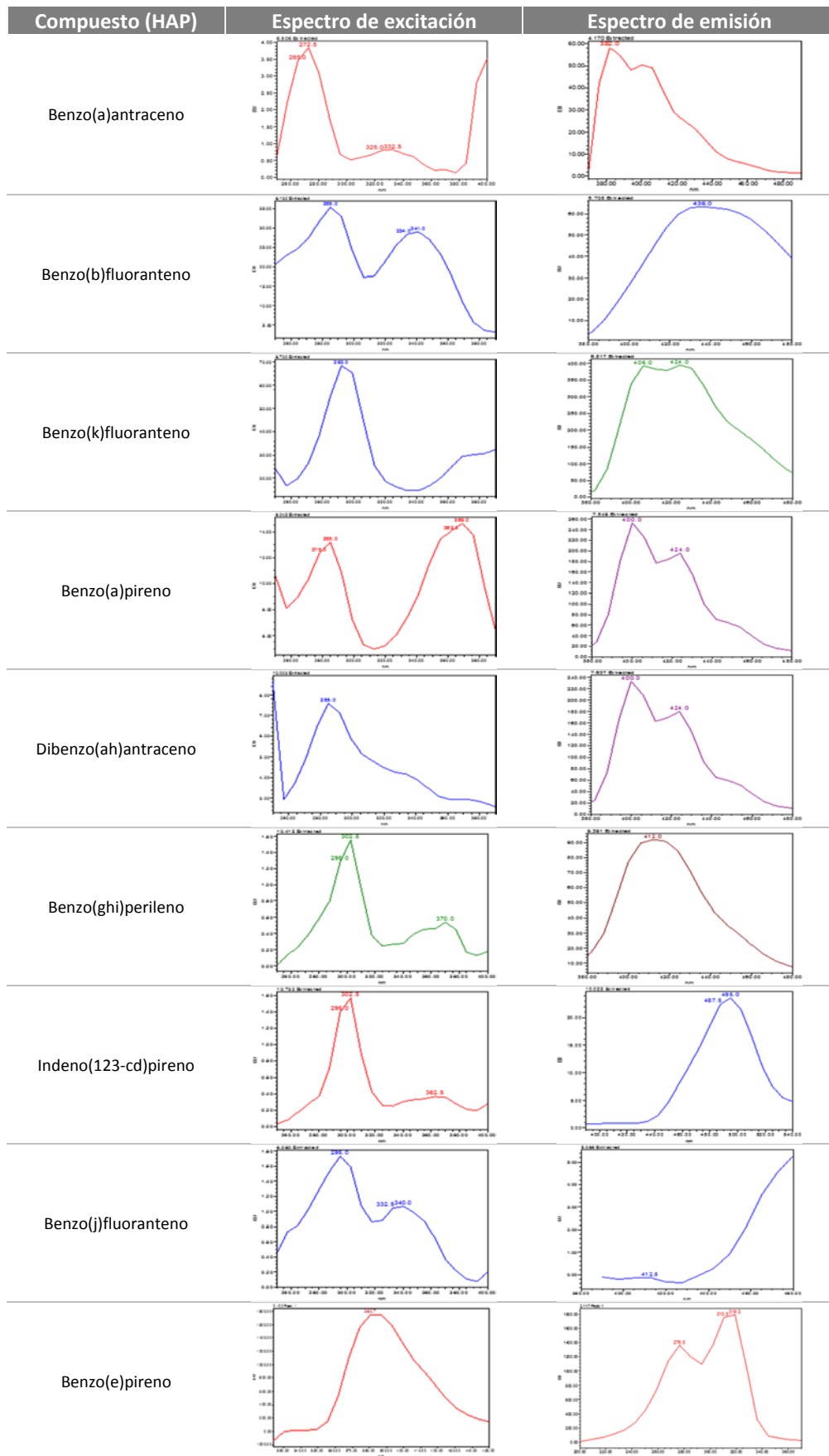
| Compuesto (HAP) | $\lambda_{\text{excitación}}$ (nm) - fija | $\lambda_{\text{emisión}}$ (nm) - margen |
|----------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------|
| Benzo(a)antraceno | 250 | 360-480 |
| Benzo(b)fluranteno | 296 | 380-480 |
| Benzo(k)fluoranteno | 296 | 380-480 |
| Benzo(a)pireno | 296 | 380-480 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 296 | 380-480 |
| Benzo(ghi)perileno | 296 | 380-480 |
| Indeno(123-cd)pireno | 250 | 360-480 |
| Benzo(j)fluoranteno | 318 | 360-480 |
| Benzo(e)pireno | 296 | 310-450 |
| 5-metilcriseno | 265 | 300-450 |
| Dibenzo(a,e)pireno | 310 | 330-600 |
| Dibenzo(a,h)pireno | 316 | 330-600 |
| Dibenzo(a,i)pireno | 304 | 330-600 |
| Dibenzo(a,l)pireno | 323 | 330-600 |

Tabla 16. Condiciones de detección de los métodos ensayados para estudiar los espectros de excitación

| Compuesto (HAP) | $\lambda_{\text{emisión}}$ (nm) - fija | $\lambda_{\text{excitación}}$ (nm) - margen |
|----------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------|
| Benzo(a)antraceno | 400 | 240-380 |
| Benzo(b)fluranteno | 400 | 240-380 |
| Benzo(k)fluoranteno | 400 | 240-380 |
| Benzo(a)pireno | 400 | 240-380 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 400 | 240-380 |
| Benzo(ghi)perileno | 400 | 240-380 |
| Indeno(123-cd)pireno | 400 | 240-380 |
| Benzo(j)fluoranteno | 500 | 240-400 |
| Benzo(e)pireno | 405 | 200-390 |
| 5-metilcriseno | 380 | 200-370 |
| Dibenzo(a,e)pireno | 390 | 200-380 |
| Dibenzo(a,h)pireno | 440 | 200-380 |
| Dibenzo(a,i)pireno | 425 | 200-380 |
| Dibenzo(a,l)pireno | 410 | 200-380 |

Así, para cada compuesto, se obtiene un diagrama de isoemisión o isoexcitación a lo largo de todo el cromatograma, a partir de los que se puede extraer, de cada pico, los espectros de emisión y excitación, en el margen de longitudes de onda escogido. En la [Tabla 17], se presentan los espectros de excitación y emisión obtenidos experimentalmente. Mientras que en la [Tabla 18], se incluyen las longitudes de onda máximas halladas en cada uno de los casos.

Tabla 17. Espectros de excitación y emisión obtenidos experimentalmente para cada uno de los compuestos a estudio.



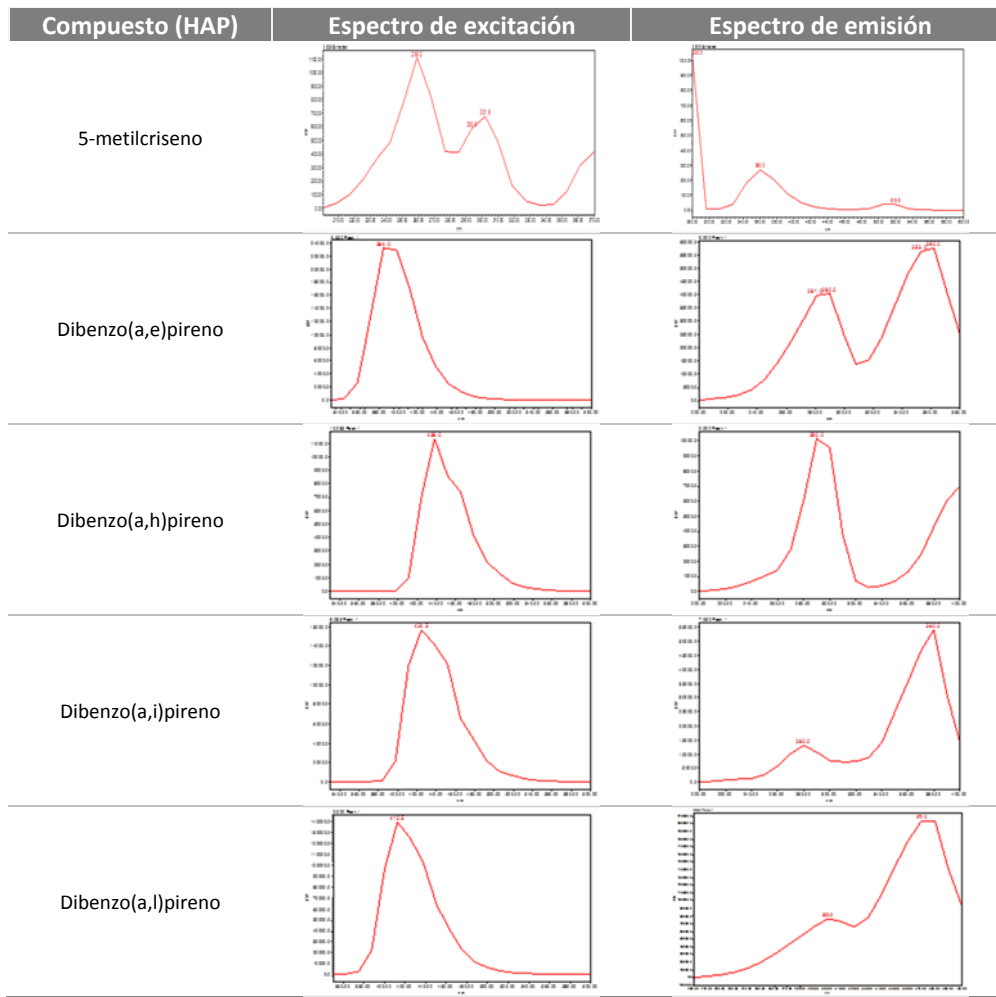


Tabla 18. Longitudes de onda de excitación y emisión máximas, extraídas del estudio experimental de espectros.

| Compuesto (HAP) | $\lambda_{\text{excitación}} \text{ (nm) máx.}$ | $\lambda_{\text{emisión}} \text{ (nm) máx}$ |
|----------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Benzo(a)antraceno | 273 ± 7 | 382 ± 7 |
| Benzo(b)fluoranteno | 285 ± 7 | 435 ± 7 |
| Benzo(k)fluoranteno | 292 ± 7 | 405 ± 7 / 420 ± 7 |
| Benzo(a)pireno | 295 ± 7 | 400 ± 7 / 424 ± 7 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 285 ± 7 | 395 ± 7 / 412 ± 7 |
| Benzo(ghi)perileno | 285 ± 7 | 412 ± 7 |
| Indeno(123-cd)pireno | 302 ± 7 | 495 ± 7 |
| Benzo(j)fluoranteno | 295 ± 7 340 ± 7 | Superior a 480 nm |
| Benzo(e)pireno | 315 ± 12 | 380 ± 12 |
| 5-metilcriseno | 290 ± 7 / 302 ± 7 | < 280 / 360 ± 7 |
| Dibenzo(a,e)pireno | 360 ± 12 | 390 ± 12 |
| Dibenzo(a,h)pireno | 290 ± 12 | 440 ± 12 |
| Dibenzo(a,i)pireno | 380 ± 12 | 425 ± 12 |
| Dibenzo(a,l)pireno | 370 ± 12 | 415 ± 12 |

Nota: el margen indicado para cada una de las longitudes, viene fijado por el número de puntos que ha sido posible adquirir en los espectros (velocidad de adquisición). Este viene definido por el margen de longitudes de onda escogidos para realizar el barrido en el método de adquisición.

Teniendo en cuenta el estudio de los espectros de excitación y emisión llevados a cabo, se seleccionan las longitudes de onda de trabajo para cada uno de los compuestos. En algunos de los compuestos, se fijan dos parejas de longitudes de onda: la pareja principal o de cuantificación

que es la que se utilizará habitualmente en la determinación y cuantificación de estos compuestos; y la secundaria o de cualificación, que se utilizará para detectar posibles interferencias en las muestras. Así, cuando se analicen muestras se podrá calcular, para un determinado HAP, la relación de señales entre parejas de longitudes de onda y se compararan con la relación obtenida con el patrón. Si la relación de señales entre patrón y muestra para un compuesto a las dos parejas de longitudes de onda escogidas es similar, se puede decir que no existe interferencia a ninguna de las dos parejas de longitudes de onda escogidas. Si por el contrario esto no sucede, se deberán estudiar los resultados obtenidos para cada pareja de longitudes de onda de forma independiente. En la presente tesis, se propone esta forma de control de interferencias para complementar la identificación de los compuestos identificados en las muestras por tiempos de retención, cuando se trabaja con el detector de fluorescencia. Este punto, se presentará más ampliamente en el Capítulo III de la presente tesis.

Se han fijado las mínimas parejas de longitudes de onda posible (aunque en ocasiones no se trabaje en el máximo) ya que, cromatográficamente, se deberán combinar para poder detectar todos los compuestos de interés. El equipo permite trabajar con ventanas de detección, es decir, variando las longitudes de onda a lo largo del cromatograma en función de los compuestos eluidos; o bien, con canales de detección, es decir, adquiriendo una determinada pareja de longitudes de onda a lo largo de todo el cromatograma, pero pudiendo adquirir hasta cuatro señales a la vez.

En este caso, cuando se trabaja con HPLC, se prefiere trabajar con canales de detección, ya que, aunque disminuye la sensibilidad, no se pierde información de picos de interés si se produce un desplazamiento en los tiempos de retención, ya sea por efecto matriz o por ligeros cambios en la temperatura de la columna.

En la [Tabla 19], se presentan las parejas de longitudes de onda escogidas para trabajar con los diferentes HAPs. Para los compuestos no incluidos (Na, Ace, Fl, Pa, An, Fa, Pyr y Cry), se seleccionan las parejas de longitudes de onda incluidas en la [Tabla 13].

Tabla 19. Longitudes de onda de excitación y emisión seleccionadas para trabajar con los diferentes HAPs a estudio.

| Compuesto (HAP) | Principal o de cuantificación | Secundaria o de cualificación |
|----------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------|
| | $\lambda_{\text{excitación}}/\lambda_{\text{emisión}}$ | |
| Benzo(a)antraceno | 296/405 | 290/430 |
| Benzo(b)fluoranteno | 296/405 | 290/430 |
| Benzo(k)fluoranteno | 296/405 | 290/430 |
| Benzo(a)pireno | 296/405 | 290/430 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 296/405 | 285/400 |
| Benzo(ghi)perileno | 296/405 | 285/400 |
| Indeno(123-cd)pireno | 318/510 | 293/485 |
| Benzo(j)fluoranteno | 318/510 | 380/500 |
| Benzo(e)pireno | 314/380 | * |
| 5-metilcriseno | 296/405 | 265/380 |
| Dibenzo(a,e)pireno | 360/390 | * |
| Dibenzo(a,h)pireno | 290/430 | * |
| Dibenzo(a,i)pireno | 380/425 | * |
| Dibenzo(a,l)pireno | 370/415 | * |

*Pendiente de determinar en este apartado. Se fijarán después de la optimización de la separación.

En el caso de las longitudes de onda, tanto principales como secundarias, correspondientes a los nuevos compuestos, se estudiarán y se valorarán más ampliamente en el apartado donde se incluye la optimización del método de separación cromatográfica.

2.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS. MÉTODO 15+1 EPA-HAPs.

En este trabajo se optimiza un método cromatográfico para la separación de los 16 HAPs de la EPA y el benzo(j)fluoranteno por HPLC-FLU. Se clasifica como método 15+1 EPA-HAPs porque el acenaftileno (incluido dentro de los 16 EPA-HAPs) no es fluorescente, tal y como se ha indicado en el apartado anterior.

Como punto de partida, se consideran las condiciones cromatográficas que se utilizan en la Sección de Cromatografía para la determinación de estos compuestos en muestras de fangos de depuradora (Bagó, 2005). Como condiciones de detección de fluorescencia, se incluyen las parejas de longitudes de onda principales incluidas en la [Tabla 19]. Como se ha comentado, se trabajará con una detección multicanal. Así, para poder detectar los 15+1 EPA-HAPs se necesitarán 6 canales de detección, por lo que se dispondrán de dos métodos de instrumento idénticos donde sólo se cambien las condiciones de detección. Dos de las parejas de longitudes de onda estarán repetidas en los dos métodos y marcarán la repetibilidad de inyección.

Así, las condiciones cromatográficas iniciales se presentan en la [Tabla 20].

Tabla 20. Condiciones cromatográficas iniciales. Optimización de la separación de los 15+1 EPA-HAPs por HPLC-FLU.

| Método 15+1 EPA-HAPs – Condiciones cromatográficas iniciales HPLC-FLU: | |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Columna | Pursuit 3 PAH (100 X 4,6 mm, 3 µm) |
| Volumen de inyección | 20 µL |
| Temperatura columna | 33°C |
| Flujo | 1 mL/min |
| Eluyente | [A] Agua MilliQ; [B] Acetonitrilo (ACN) |
| Gradiente elución | 0 - 3 min: [A] 60% [B] 40% 20-28 min: [A] 0% [B] 100% - Curva: 6 (lineal) 29-33 min: [A] 60% [B] 40% (Estabilización en condiciones iniciales) |
| Tiempo de cromatograma | 33 min |
| Condiciones detección [1] | Canal 1: 280/340 [Na, Ace, Fl] Canal 2: 250/376 [Fe, An] Canal 3: 285/260 [Pa] Canal 4: 296/405 [BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP] |
| Condiciones detección [2] | Canal 1: 280/340 [Na, Ace, Fl] Canal 2: 296/405 [BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP] Canal 3: 333/390 [Pyr] Canal 4: 318/500 [BjF, IP] |

En la [Figura 7], se presenta una superposición de los seis cromatogramas obtenidos al analizar un patrón de 80 ng/mL de los 16 EPA-HAPs con BfF preparado en acetonitrilo. Se incluye la identificación de los picos y el gradiente de elución utilizado. Cabe destacar, que el gradiente no considera el tiempo muerto del sistema, que en este caso sería del orden de 1 min, sino que incluye los tiempos del gradiente del método de instrumento.

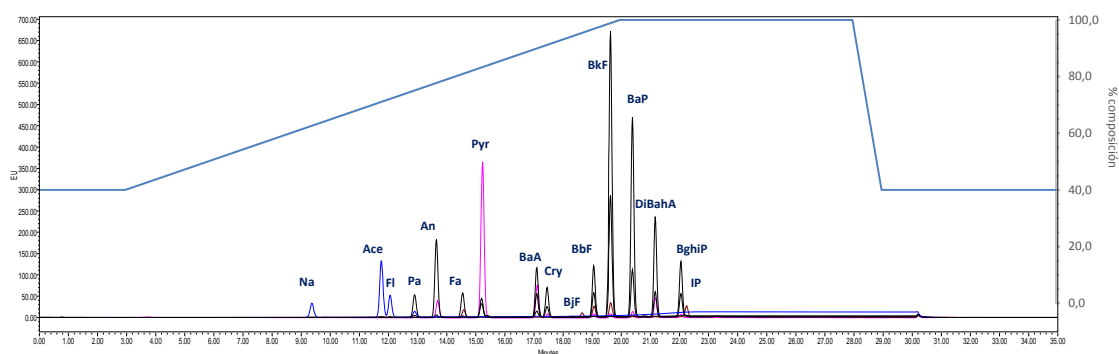


Figura 7. Superposición de cromatogramas de un patrón de 80 ng/mL de los 15+1 EPA-HAPs. Método cromatográfico inicial HPLC-FLU.

Como se puede observar, todos los HAPs a estudio se separan en las primeras condiciones ensayadas pero en un tiempo de elución de los picos de aproximadamente 23 min (tiempo total de cromatograma 35 min). Las tres parejas críticas Ace-Flu, BaA-Cry y BbF-BkF, se separan correctamente. El benzo(j)fluoranteno, compuesto no estudiado hasta el momento, se eluye justo delante del BbF y se caracteriza porque no da señal a la pareja de longitudes de onda donde se detectan sus isómeros, BbF y BkF. Además, la señal que se obtiene es claramente más baja. El IP es el último de los compuestos eluidos y aparece muy cerca del BghiP. En este caso, igual que sucede con el BjF, tampoco es interferencia porque se detectan a diferentes longitudes de onda.

Teniendo en cuenta este cromatograma inicial, se pretende modificar las condiciones cromatográficas con la finalidad de disminuir el tiempo de cromatograma manteniendo una buena resolución entre los picos. Para valorar las diferentes condiciones, se considerará la resolución entre las parejas de compuestos: Ace-Flu y BaA-Cry, además del tiempo de retención del BghiP como indicativo del tiempo global del cromatograma.

Se propone realizar cambios en el gradiente de elución, en el flujo y en la temperatura de trabajo.

En lo que hace referencia a los gradientes de elución, en la [Tabla 21] se presentan las condiciones ensayadas más significativas. Se realizan cambios centrados en la reducción del tiempo inicial del cromatograma en el que no se eluye ningún pico disminuyendo el porcentaje de componente acuoso. En la [Tabla 22], se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 21. Gradientes de elución. Optimización de la separación de los 15+1 EPA-HAPs por HPLC-FLU.

| Cambios en el gradiente de elución | |
|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Gradiente 0 (inicial) | 0 - 3 min: [A] 60% [B] 40% 20-28 min: [A] 0% [B] 100% - Curva: 6 (lineal) 29-33 min: [A] 60% [B] 40% (Estabilización en condiciones iniciales) |
| Gradiente 1 | 0 - 1 min: [A] 45% [B] 55% 15-20 min: [A] 0% [B] 100% - Curva: 6 (lineal) 21-25 min: [A] 45% [B] 55% (Estabilización en condiciones iniciales) |
| Gradiente 2 | 0 - 6 min: [A] 35% [B] 65% 12-20 min: [A] 0% [B] 100% - Curva: 6 (lineal) 21-25 min: [A] 35% [B] 65% (Estabilización en condiciones iniciales) |
| Gradiente 3 | 0 min: [A] 50% [B] 50% 7 min: [A] 35% [B] 65% - Curva: 6 (lineal) 11-20 min: [A] 0% [B] 100% - Curva: 6 (lineal) 21-25 min: [A] 50% [B] 50% (Estabilización en condiciones iniciales) |

Tabla 22. Estudio de los gradientes de elución para la optimización de la separación de los 15+1 EPA-HAPs por HPLC-FLU. Resultados de resolución (Rs (Ace-Flu); Rs (BaA-Cry)) y tiempo de retención (tr) de BghiP.

| Parámetro | Gradiente 0 | Gradiente 1 | Gradiente 2 | Gradiente 3 |
|----------------------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|
| Rs (Ace-Flu) | 1,4 | <0,8 | Picos solapados | 1,2 |
| Rs (BaA-Cry) | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 1,7 |
| t _r BghiP (min) | 22,1 | 16,7 | 15,2 | 15,3 |

Como se puede observar, el gradiente 3 es el que presenta mejores resultados ya que, aunque la resolución entre Ace-Flu es ligeramente inferior que con el gradiente inicial, el tiempo de retención del BghiP se consigue reducir casi 7 minutos.

Considerando estas nuevas condiciones de gradiente, se propone realizar cambios en el flujo de trabajo y la temperatura de la columna. En la [Tabla 23] se incluyen las condiciones ensayadas en ambos casos. En la [Tabla 24] y la [Tabla 25], se presentan los resultados obtenidos en los estudios de cambio de flujo y de temperatura, respectivamente.

Tabla 23. Cambios en el flujo y la temperatura de trabajo. Optimización de la separación de los 15+1 EPA-HAPs por HPLC-FLU.

| Cambios en el flujo de trabajo | | Cambios en la temperatura(*) | |
|---------------------------------------|------------|-------------------------------------|------|
| Flujo 0 (inicial) | 1,0 mL/min | Temperatura 0 (inicial) | 33°C |
| Flujo 1 | 1,2 mL/min | Temperatura 1 | 30°C |
| Flujo 2 | 1,5 mL/min | Temperatura 2 | 35°C |
| | | Temperatura 3 | 38°C |

(*) Los cambios de temperatura se han realizado con un flujo de 1,2 mL/min

Tabla 24. Cambios de flujo. Optimización de la separación de los 15+1 EPA-HAPs por HPLC-FLU. Resultados de resolución (Rs (Ace-Flu); Rs (BaA-Cry)) y tiempo de retención (tr) de BghiP.

| Parámetro | Flujo 0 1 mL/min | Flujo 1 1,2 mL/min | Flujo 2 1,5 mL/min |
|----------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| Rs (Ace-Flu) | 1,2 | 1,1 | 1,0 |
| Rs (BaA-Cry) | 1,7 | 1,4 | 1,3 |
| t _r BghiP (min) | 15,3 | 13,9 | 13,0 |

Tabla 25. Cambios de temperatura. Optimización de la separación de los 15+1 EPA-HAPs por HPLC-FLU. Resultados de resolución (Rs (Ace-Flu); Rs (BaA-Cry)) y tiempo de retención (tr) de BghiP.

| Parámetro | Temperatura 1 30°C | Temperatura 0 33°C | Temperatura 2 35°C | Temperatura 3 38°C |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Rs (Ace-Flu) | 1,1 | 1,1 | <0,8 | <0,8 |
| Rs (BaA-Cry) | 1,4 | 1,4 | 1,1 | <0,8 |
| t _r BghiP (min) | 14,4 | 13,9 | 13,6 | 13,2 |

Como era de esperar, un cambio de flujo provoca una disminución en los tiempos de retención. En lo que hace referencia a la resolución entre picos, si se trabaja en modo isocrático no se vería afectada. Sin embargo, en este caso, como se trabaja en gradiente, la separación se ve ligeramente afectada porque el cambio de flujo hace variar el momento de inicio del cambio de la composición, provocando una ligera disminución de la resolución de las parejas críticas. A pesar de ello, los valores obtenidos en todos los casos, son superiores o iguales a 1. Así, es posible trabajar tanto con flujos de 1,2 y 1,5 mL/min.

Al aumentar la temperatura se observa como la resolución entre las parejas críticas disminuye considerablemente. También disminuyen los tiempos de retención pero no de forma tan significativa. Así, se preferirá trabajar a temperaturas entre 30°C y 33°C. No se considera conveniente trabajar con temperaturas de columna cercanas a la temperatura ambiente, ya que los hornos de los que se dispone calientan pero no enfrían, y consecuentemente, no conseguiría estabilizar correctamente la temperatura de trabajo.

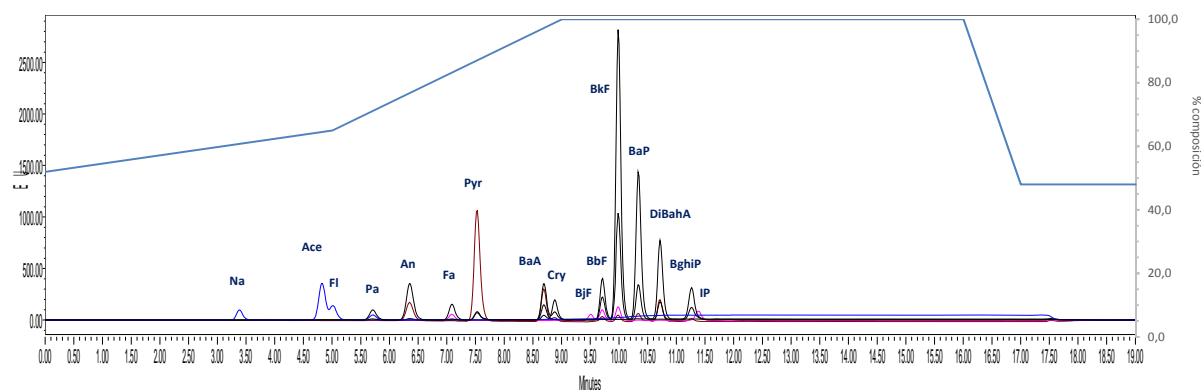
Sin embargo, hay que tener en cuenta, que al aumentar el flujo de la fase móvil la presión de trabajo aumenta. Un cambio de 1,2 a 1,5 mL/min provoca un aumento de unas 400 psi (33 bar). Además, la disminución de la temperatura también juega en el mismo sentido en lo que hace referencia a la presión y la hace aumentar aproximadamente 33 psi cada °C disminuido. A pesar del efecto negativo que provoca sobre la presión un aumento de flujo y una disminución de temperatura, se prefiere trabajar en estas nuevas condiciones para conseguir mejores separaciones entre parejas críticas y mínimo tiempo de análisis. Si se trabaja a flujo 1,5 mL/min y 30°C, la presión de trabajo en condiciones iniciales de gradiente es de 2500 psi, que se encuentra lejos de la presión máxima de trabajo de la columna (5000 psi).

Así, en estas nuevas condiciones de flujo y de temperatura, se decide ajustar el gradiente de elución. En la [Tabla 26], se presentan las condiciones cromatográficas definitivas. En la [Figura 8], se presentan los cromatogramas obtenidos en estas nuevas condiciones. Se incluyen los picos identificados y el gradiente de elución del método de instrumento.

Tabla 26. Condiciones cromatográficas definitivas. Optimización de la separación de los 15+1 EPA-HAPs por HPLC-FLU.

| Método 15+1 EPA-HAPs – Condiciones cromatográficas iniciales HPLC-FLU: | |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Columna | Pursuit 3 PAH (100 X 4,6 mm, 3 µm) |
| Volumen de inyección | 20 µL |
| Temperatura columna | 30°C |
| Flujo | 1,5 mL/min |
| Eluyente | [A] Agua MilliQ; [B] Acetonitrilo (ACN) |
| Gradiente elución | 0 min: [A] 48% [B] 52% 5 min: [A] 35% [B] 65% - Curva: 6 (lineal) 9-16 min: [A] 0% [B] 100% - Curva: 6 (lineal) 16-19 min: [A] 50% [B] 50% (Estabilización en condiciones iniciales) |
| Tiempo de cromatograma | 20 min |
| Condiciones detección [1] | Canal 1: 280/340 [Na, Ace, Flu] Canal 2: 250/376 [Fe, An] Canal 3: 285/260 [Pa] Canal 4: 296/405 [BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP] |
| Condiciones detección [2] | Canal 1: 280/340 [Na, Ace, Flu] Canal 2: 296/405 [BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP] Canal 3: 333/390 [Pyr] Canal 4: 318/500 [BjF, IP] |

Figura 8. Superposición de cromatogramas de un patrón de 80 ng/mL de los 15+1 EPA-HAPs. Método cromatográfico definitivo por HPLC-FLU.



En las condiciones cromatográficas propuestas, el último de los 15+1 EPA-HAPs, el IP se eluye a un tiempo de retención de 11,4 min. Por lo que se ha conseguido reducir en 11 min el tiempo de cromatograma, respecto a las condiciones iniciales de separación.

Así, el orden de elución de los 15+1 EPA-HAPs, junto con sus tiempos de retención y sus tiempos de retención relativos al BaP se presentan en la [Tabla 27].

Tabla 27. Método 15+1 EPA-HAPs. Orden de elución de los 16 compuestos con sus tiempos de retención (tr) y sus tiempos de retención relativos al BaP (trR(BaP)).

| Compuesto (HAP) | tr(min) | trR (BaP) |
|-----------------------|-------------|-----------|
| Naftaleno | 3,4 | 0,33 |
| Acenafteno | 4,8 | 0,46 |
| Fluoreno | 5,0 | 0,48 |
| Fenantreno | 5,8 | 0,55 |
| Antraceno | 6,4 | 0,62 |
| Fluoranteno | 7,1 | 0,68 |
| Pireno | 7,5 | 0,72 |
| Benzo(a)antraceno | 8,7 | 0,84 |
| Criseno | 8,9 | 0,86 |
| Benzo(j)fluoranteno | 9,5 | 0,91 |
| Benzo(b)fluoranteno | 9,7 | 0,93 |
| Benzo(k)fluoranteno | 10 | 0,96 |
| Benzo(a)pireno | 10,4 | 1 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 10,7 | 1,03 |
| Benzo(ghi)perileno | 11,3 | 1,09 |
| Indeno(123-cd)pireno | 11,4 | 1,10 |

2.3. ADAPTACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO 15+1 EPA-HAPs PARA LA DETERMINACIÓN DE BeP, CP(cd)P, 5-MeCrY Y LOS CUATRO ISÓMEROS DEL DiBP.

Una vez optimizado el método cromatográfico para la determinación de los 15+1 EPA-HAPs, se propone adaptarlo para poder determinar, además, el benzo(e)pireno, el ciclopenta(cd)pireno, el 5-metilcriseno y los cuatro isómeros del dibenzopireno (dibenzo(a,e)pireno, dibenzo(a,h)pireno, dibenzo(a,i)pireno y dibenzo(a,l)pireno).

2.3.1. Estudio de las condiciones cromatográficas para el BeP.

Se trabaja con las condiciones de separación propuestas para la separación de los 15+1 EPA-HAPs [Tabla 26], pero se modifican las condiciones de detección para incluir la longitud de onda específica para la determinación del BeP (314/380).

En estas condiciones, se inyecta un patrón conjunto de los 16 EPA-HAPs de 500 ng/mL y el mismo patrón adicionado con BeP veinte veces más diluido (25 ng/mL para todos los HAPs). En la [Figura 9] y en la [Figura 10], se presentan los cromatogramas obtenidos a la pareja de longitudes de onda 314/380 característica del BeP y a 296/405, respectivamente.

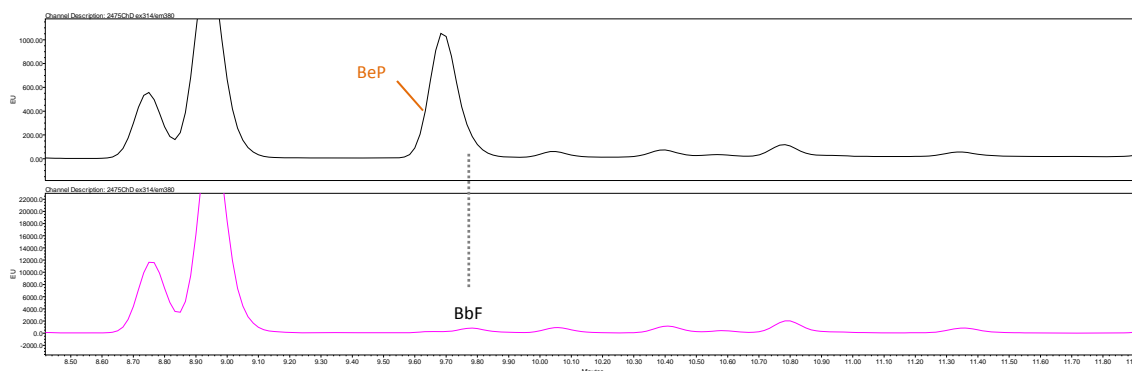


Figura 9. Superposición de los cromatogramas obtenidos a 314/380 nm. [Superior] patrón de los 16 EPA-HAPs (500 ng/mL); [Inferior] el mismo patrón adicionado con BeP (25 ng/mL para todos los HAPs). Ampliación de la zona de elución del BeP (8,5 a 11,9 min).

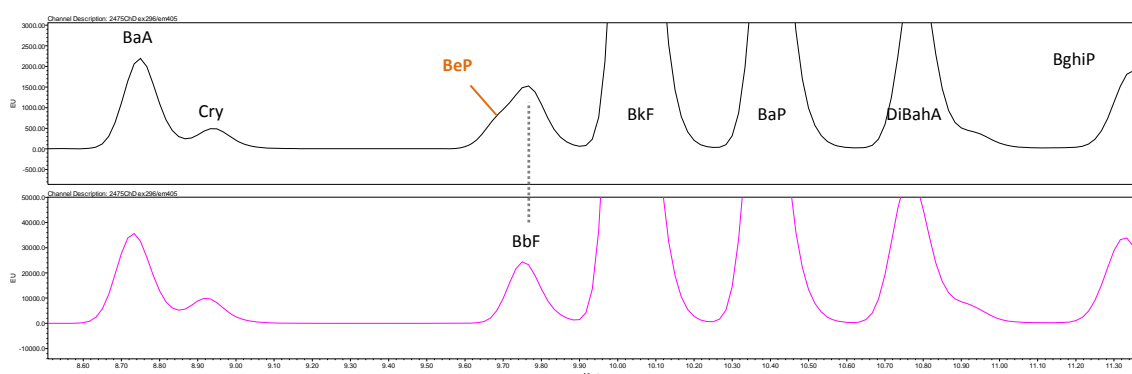


Figura 10. Superposición de los cromatogramas obtenidos a 296/405 nm. [Superior] patrón de los 16 EPA-HAPs (500 ng/mL); [Inferior] el mismo patrón adicionado con BeP (25 ng/mL para todos los HAPs). Ampliación de la zona de elución del BeP (8,6 a 11,3 min).

Como se puede observar, en las condiciones de trabajo, el BeP se eluye a un tiempo de retención de unos 9,65 min, justo delante del BbF, y se deberían cuantificar conjuntamente. Si se quiere mejorar la selectividad entre ambos compuestos se deberían considerar la influencia de respuestas de ambos compuestos a las diferentes longitudes de onda ensayadas.

Con la finalidad de conocer, en qué grado afecta la presencia del BeP sobre el BbF a las diferentes longitudes de onda de trabajo, se inyecta de forma independiente un patrón de BeP y un patrón con los 16 EPA-HAPs de la misma concentración (1000 ng/mL). A partir del área obtenida en cada caso, se calcula su influencia relativa [Tabla 28].

Tabla 28. Influencia relativa (BeP vs. BbF) a las diferentes longitudes de onda ensayadas.

| $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ | Área BbF (EU*min) | Área BeP (EU*min) | Σ areas (BeP; BbF) | % BeP | % BbF |
|-------------------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|-------|-------|
| 250/376 (secundaria BeP) | nd | 16003203 | 16003203 | 100 | 0 |
| 280/340 | 3367627 | nd | 3367627 | 0 | 100 |
| 285/460 | 2713026931 | 19585880 | 2732612811 | 0,72 | 99,3 |
| 296/405 (principal BbF) | 1403151466 | 91026355 | 1494177821 | 6,1 | 93,9 |
| 290/430 (secundaria BbF) | 3321343569 | 14452618 | 3335796187 | 0,43 | 99,6 |
| 318/500 | 818358983 | 742373 | 819101356 | 0,09 | 99,9 |
| 333/390 | 404553733 | 165020247 | 569573980 | 29,0 | 71,0 |
| 314/380 (principal BeP) | 25984630 | 135949024 | 161933654 | 84,0 | 16,0 |

Nd: no detectado

A las longitudes de onda de trabajo habituales para el BbF, la presencia de BeP prácticamente no le afecta. El BeP representa un 6,1% y un 0,43% del área total (BbF+BeP) a la pareja de longitudes de onda principal del BbF y secundaria, respectivamente. En lo que hace referencia a la pareja de longitudes de onda principal para el BeP (representa sus longitudes de onda máximas de excitación y emisión), el BbF tendría una señal que representaría el 16% del área suma. Así, para poder asegurar la señal del BeP, se propone escoger como su pareja de longitudes de onda secundaria 250/376, pareja de longitudes de onda principal para el fenantreno y antraceno.

En la [Tabla 29], se resumen las parejas de longitudes de onda, primarias y secundarias escogidas para el benzo(e)pireno. Esta tabla complementa la [Tabla 19] donde, para este compuesto sólo se incluía la pareja de longitudes de onda correspondiente a los máximos de excitación y emisión.

Tabla 29. Longitudes de onda de excitación y emisión seleccionadas para trabajar con el BeP. Complementa la [Tabla 19].

| Compuesto (HAP) | Principal o de cuantificación | Secundaria o de cualificación |
|-----------------|--------------------------------------------|-------------------------------|
| | $\lambda_{excitación} / \lambda_{emisión}$ | |
| Benzo(e)pireno | 314/380 | 250/376 |

2.3.2. Estudio de las condiciones cromatográficas para los isómeros del DiBP.

La optimización de la separación de los cuatro isómeros del dibenzopireno (dibenzo(ah)pireno, dibenzo(ae)pireno, dibenzo(ai)pireno y dibenzo(al)pireno), se lleva a cabo, inicialmente, por HPLC con detector de *diode array* (DAD). De esta manera, es posible realizar un mejor seguimiento de los tiempos de retención de los nuevos compuestos ya que todos los HAPs dan señal a UV a 254 nm. Sin embargo, se debe tener en cuenta, que los límites de detección del

detector DAD son superiores que los del fluorescencia, por lo que las concentraciones de las disoluciones inyectadas deben ser superiores.

Para el estudio, se trabajará con disoluciones individuales de cada uno de los dibenzopirenos de 100 mg/L preparadas en acetonitrilo, a excepción del patrón de dibenzo(ai)pireno que se inyectará directamente la disolución concentrada ya que ésta es de 10 mg/L.

Como método de separación, se partirá de las condiciones de separación propuestas para el método de los 15+1 EPA-HAPs, incluidas en la [Tabla 26], pero modificando las condiciones de detección. Como longitud de onda de trabajo se fijará 254 nm con una anchura de banda de 4 nm (± 2 nm) donde se detectan todos los HAPs y 210 (± 2 nm) donde absorben prácticamente todos compuestos orgánicos con grupos funcionales y dobles enlaces. En la [Figura 11], se presenta una superposición de los cromatogramas obtenidos.

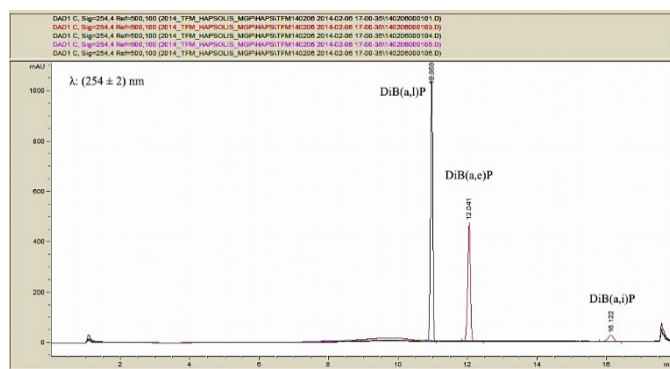


Figura 11. Superposición de los cromatogramas obtenidos al analizar las disoluciones individuales de los cuatro isómeros del DiBP por HPLC-UV ($\lambda=254$ (4) nm)

Como se puede observar, los compuestos a estudio se eluyen en la zona de máximo poder eluotrópico (100% ACN), además el DiB(ah)P no se detecta en las condiciones ensayadas ya que probablemente se eluye más tarde. Así, **el orden de elución de los cuatro isómeros del DiBP es: DiB(al)P, DiB(ae)P, DiB(ai)P y DiB(ah)P.**

A la vista de los resultados obtenidos, se propone iniciar la elución con un 80% de ACN y en 5 min aumentar hasta 100% donde se mantendrá durante 10 min. De esta manera, aunque se pierde la separación inicial, se amplía la zona en la que el eluyente tiene un mayor poder eluotrópico para favorecer la elución de los compuestos más pesados.

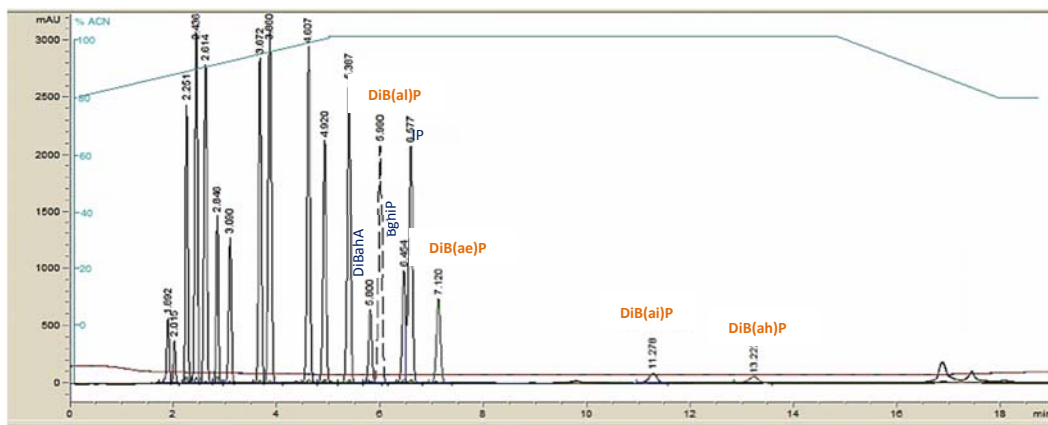


Figura 12. Superposición de los cromatogramas obtenidos para los 16 EPA-HAPs y los cuatro isómeros del DiBP ($\lambda=210$ (4) nm). Se incluye la representación del gradiente de elución utilizado.

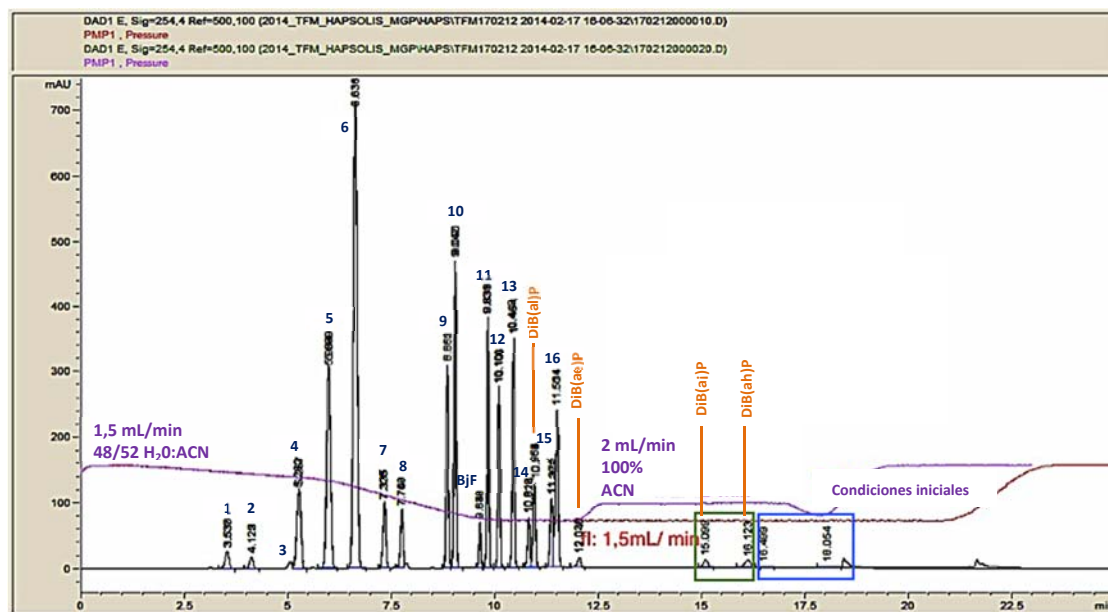
En estas condiciones, se consiguen eluir los cuatro isómeros del DiBP siendo el último de ellos el DiB(ah)P con un tiempo de retención de 13,2 min. Además, los cuatro isómeros se separan entre sí y de los compuestos más pesados de los 16 EPA-HAPs. Cabe destacar, que el DiB(al)P se eluye entre el DiBahA y el BghiP, mientras que los otros tres isómeros se eluyen después del último de los 16 EPA-HAPs.

Para acelerar la elución de los compuestos más pesados y mantener la separación inicial, se decide mantener el gradiente inicial propuesto en el métodos de los 15+1 EPA-HAPs y en la zona isocrática con 100 % ACN, incluir un gradiente de flujo. Así, en el minuto 12 se aumenta el flujo de 1,5 mL/min a 2 mL/ min.

Otra alternativa que se plantea para poder acelerar la elución de los compuestos más pesados, es cambiar el componente orgánico de la mezcla y sustituirlo o mezclarlo con un modificador orgánico de mayor poder eluotrópico que el ACN, por ejemplo, tetrahidrofurano o isopropanol. La adición de isopropanol se desestima porque provoca un aumento demasiado grande de la presión, insoportable para el sistema y la columna, obligando a disminuir drásticamente el flujo. El uso de tetrahidrofurano también se descarta porque la proporción a adicionar es elevada y el equipo no está adaptado para trabajar en estas condiciones⁶.

En la [Figura 13] se presenta una superposición de los cromatogramas obtenidos al analizar a 254 nm, tanto una disolución conjunta de los 16 EPA-HAPs con BjF (1 mg/L) como una disolución de los cuatro isómeros del dibenzopireno de la misma concentración. También se presenta la variación de la presión, donde se puede observar el efecto del cambio de flujo programado para acelerar la elución de los compuestos pesados.

⁶ El tetrahidrofurano (THF) es un disolvente de uso limitado en los equipos de HPLC que tienen conexiones de *peek* (*polyether ether cetone*, polímero orgánico termoplástico), ya que debilita el tubo y provoca su rotura a corto/medio plazo. Máxima proporción de THF en la fase móvil: 15%.



| | | | |
|--------|--------|---------|------------|
| 1. Na | 5. Fe | 9. BaA | 13. BaP |
| 2. Acy | 6. An | 10. Cry | 14. DiBahA |
| 3. Ace | 7. Pa | 11. BbF | 15. BghiP |
| 4. Fl | 8. Pyr | 12. BkF | 16. IP |

Figura 13. Superposición de los cromatogramas correspondientes a una disolución de los 16 EPA-HAPs con B_jF y una disolución de los isómeros del dibenzopireno ($\lambda=250$ (4) nm). Se incluye la representación del cambio de presión y la identificación de los picos.

Con el aumento de flujo en la zona de máximo poder eluotrópico, se consigue acelerar la elución de los isómeros del dibenzopireno (DiB(ai)P y DiB(ah)P), conservando la separación de los 16 EPA-HAPs. En estas condiciones, el último de los compuestos eluidos tiene un tiempo de retención de 16 min.

Este aumento de flujo provoca un aumento de consumo de ACN (que queda compensado con la reducción del tiempo de cromatograma) y un aumento de presión. Éste aumento es inferior al que se tiene en las condiciones iniciales cuando el contenido de agua en la fase móvil es mayor.

Cabe destacar, que como este estudio se ha llevado a cabo con un detector de DAD, es posible la detección del acenaftileno. Éste se eluye entre el pico de naftaleno y el de acenafteno con un tiempo de retención de unos 4,1 min ($\text{trR}(\text{BaP})=0,39$).

En la [Tabla 30], se presentan las condiciones de separación propuestas, para incorporar la determinación de los isómeros del dibenzopireno al método de separación optimizado para los 15+1 EPA-HAPs.

Tabla 30. Condiciones de separación para incorporar la determinación de los isómeros del DiBP al método de separación de los 15+1 EPA-HAPs por HPLC.

| Método 15+1 EPA-HAPs + isómeros DiBP – Condiciones de separación por HPLC | | | |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------|
| Columna | Pursuit 3 PAH (100 X 4,6 mm, 3 μm) | | |
| Volumen de inyección | 20 μL | | |
| Temperatura columna | 30°C | | |
| Flujo | 1,5 mL/min (inicial) | | |
| Eluyente | [A] Agua MilliQ; [B] Acetonitrilo (ACN) | | |
| Gradiente de elución y de flujo | 0 min: | [A] 48% [B] 52% | F=1,5 mL/min |
| | 5 min: | [A] 35% [B] 65% - Curva: 6 (lineal) | F=1,5 mL/min |
| | 9 - 12 min: | [A] 0% [B] 100% - Curva: 6 (lineal) | F=1,5 mL/min |
| | 12,5 - 17 min: | [A] 0% [B] 100% - Curva: 6 (lineal) | F=2,0 mL/min |
| | 18-23 min: | [A] 48% [B] 52% | F=1,5 mL/min |
| Tiempo de cromatograma | 23 min | | |

Como la determinación de estos compuestos se va a llevar a cabo con detección de fluorescencia, se propone inyectar en las nuevas condiciones cromatográficas un patrón conjunto que incluya los 16 EPA-HAPs y los cuatro isómeros del DiBP por HPLC-FLU. Para la detección por fluorescencia de los dibenzopirenos, se fijan las longitudes de excitación y emisión obtenidas experimentalmente a partir del estudio de espectros [Tabla 19]. Así, el patrón conjunto se inyecta por triplicado en tres métodos que tienen las mismas condiciones de separación [Tabla 30], pero diferentes condiciones de detección. Los dos primeros métodos incluyen las parejas de longitudes de onda principales para la determinación de los 15+1 EPA-HAPs y el tercero, las parejas específicas para los isómeros del dibenzopireno.

En la [Figura 14], se representan los cromatogramas para cada pareja de longitudes de onda, tanto las ya existentes para el análisis de los 15+1 EPA-HAPs, como los canales con las nuevas parejas de longitudes de onda correspondientes a los isómeros del dibenzopireno.

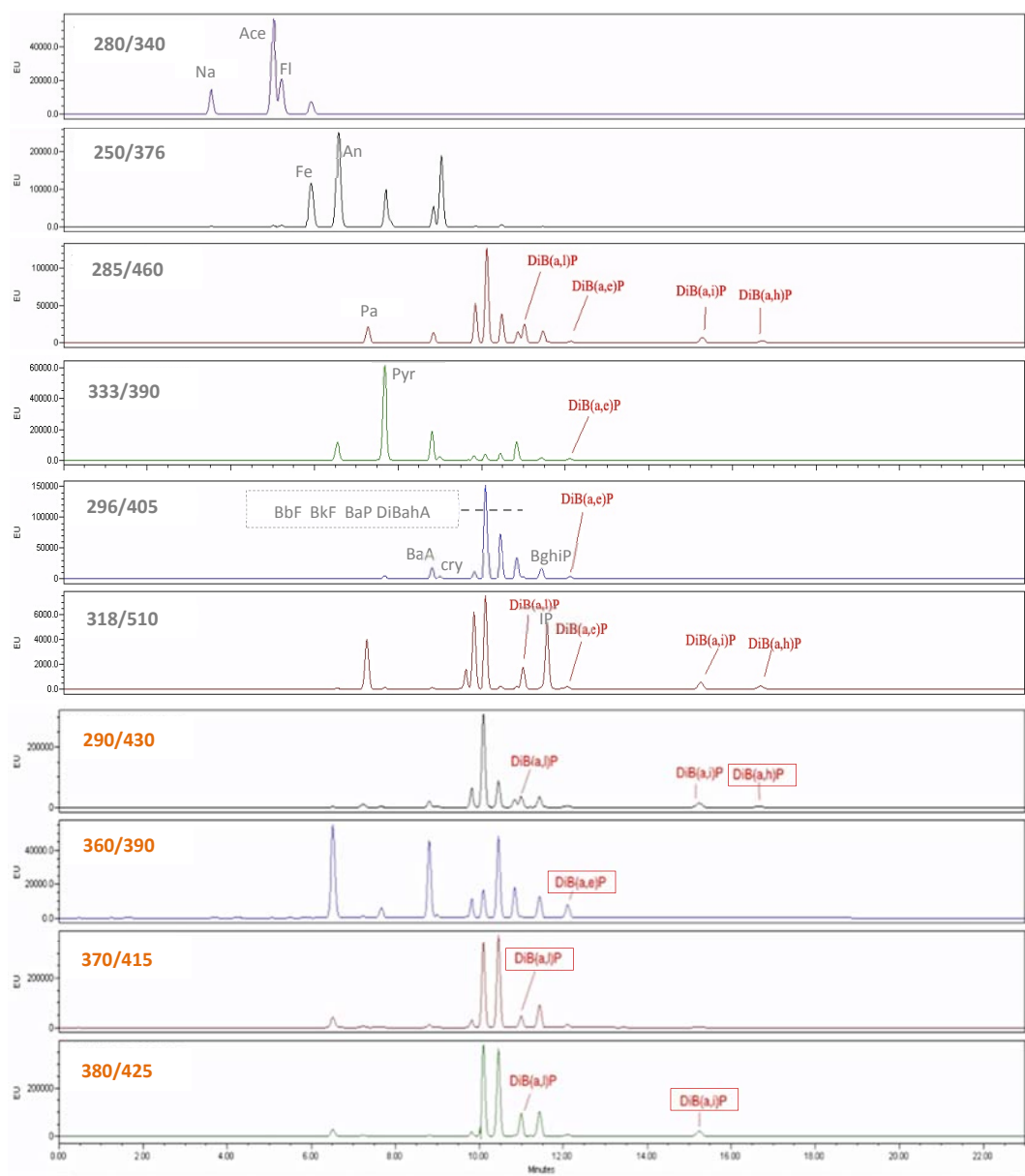


Figura 14. Superposición de los cromatogramas obtenidos al analizar un patrón con los 16 EPA-HAPs y los cuatro isómeros del DiBP. En cada cromatograma se especifica la pareja de longitudes de onda de detección de fluorescencia y los picos de los dibenzopirenos identificados.

A las longitudes de onda escogidas para cada uno de los isómeros, realmente se detecta el compuesto con máxima señal. Además, para los isómeros *ah*, *ae* y *ai*, como se eluyen en una zona donde no aparece ninguno de los 15+1 EPA-HAPs no hay problema de posibles interferencias.

Sin embargo, hay que destacar que el DiB(a,l)P se eluye justo detrás del DiB(a,h)A, y que a las parejas de longitudes de onda 290/430 y 285/450 ambos compuestos tienen señales parecidas. Así, que si se quiere conseguir máxima selectividad entre estos dos compuestos, se debería trabajar, en cada caso, a la pareja de longitudes de onda que sólo uno de ellos de señal.

El DiB(a,h)A se determina habitualmente a 296/405 y, como se puede observar, a estas longitudes de onda el DiB(a,l)P prácticamente no da señal. La longitud de onda escogida para el DiB(a,l)P es 370/415 aunque también podría ser la correspondiente al DiB(a,i)P 380/425. A ninguna de estas parejas de longitudes de onda el DiB(a,h)A da señal, por lo que no es interferencia.

De las longitudes de onda que se escogen habitualmente para la determinación de los 15+1 EPA-HAPs, la pareja 318/510 correspondiente al B_jF y al IP, sería la más adecuada para la determinación de los cuatro isómeros del dibenzopireno. Así, se puede escoger como pareja de longitudes de onda secundarias para este grupo de compuestos. Además, hay que destacar que a estas longitudes de onda el DiBahA tampoco da señal.

En la [Tabla 31], se resumen las parejas de longitudes de onda, primarias y secundarias escogidas para los isómeros del dibenzopireno. Esta tabla complementa la [Tabla 19] donde, para este grupo de compuestos, sólo se incluían las parejas de longitudes de onda correspondientes a los máximos de excitación y emisión.

Tabla 31. Longitudes de onda de excitación y emisión seleccionadas para trabajar con los cuatro isómeros del dibenzopireno. Complementa la [Tabla 19].

| Compuesto (HAP) | Principal o de cuantificación | Secundaria o de cualificación |
|--------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------|
| | $\lambda_{\text{excitación}}/\lambda_{\text{emisión}}$ | |
| Dibenzo(a,e)pireno | 360/390 | 318/510 |
| Dibenzo(a,h)pireno | 290/430 | 318/510 |
| Dibenzo(a,i)pireno | 380/425 | 318/510 |
| Dibenzo(a,l)pireno | 380/425 | 318/510 |

2.3.3. Estudio de las condiciones cromatográficas para el CP(cd)P y el 5-MeCry.

Igual que para los isómeros del dibenzopireno, se realiza un estudio de los tiempos de retención correspondientes al ciclopenta(cd)pireno y el 5-metilcriseno en las condiciones cromatográficas del métodos 15+1 EPA-HAPs. Se lleva a cabo por HPLC con detector ultravioleta, ya que el ciclopenta(cd)pireno no es fluorescente.

Para ello, se inyectan por separado dos disoluciones de HAPs de 1000 ng/mL, una la que se incluyen los 16 EPA-HAPs a partir del patrón concentrado PAH MIX 9 y otra a partir de la disolución PAH MIX 170. Esta segunda disolución incluye los 15 HAPs prioritarios para la SCF. A continuación, se indican los HAPs comunes en los dos patrones y los que sólo están presentes en alguna de las dos disoluciones patrón:

| | |
|-----------------------------------------|------------------------------------------------------|
| HAPs comunes [PAH MIX 9 y PAH MIX 170]: | BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP e IP. |
| Presentes en PAH MIX 9: | Na, Ace, Acy, Fl, Fe, An, Pa y Pyr. |
| Presentes en PAH MIX 170: | B _j F, CP(cd)P, 5MeCry y 4 isómeros DiBP. |

Ambos patrones se inyectan en las condiciones de separación propuestas para el método de los 15+1 EPA-HAPs [Tabla 26], pero las condiciones de detección se fijan a 254 nm. Bibliográficamente, se conoce que en la columna propuesta el 5-metilcriseno se eluye después del criseno pero antes del benzo(j)fluoranteno. (ASPCAT, Agilent, & UB, 2012)

En la [Figura 15], se presenta una superposición de los dos cromatogramas obtenidos a 254 nm.

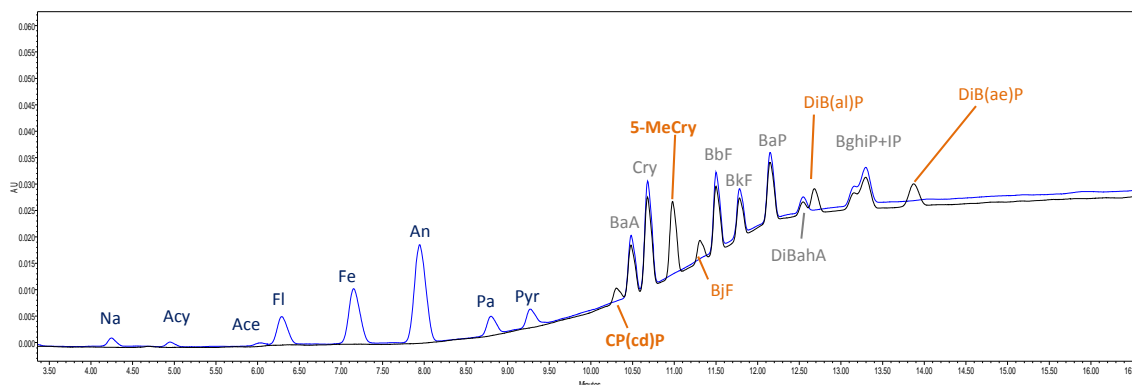


Figura 15. Superposición de los cromatogramas correspondientes a los patrones PAH MIX 9 y PAH MIX 170 (1000 ng/mL). Método cromatográfico: 15+1 EPA-HAPs.

Como se puede observar, se confirma que el ciclopenta(cd)pireno se eluye delante del benzo(a)antraceno y el 5-metilcriseno después del criseno, y se confirma que en las condiciones ensayadas se separan entre sí los 24 HAPs a estudio. Es importante destacar que los dos últimos isómeros del dibenzopireno (DiBaiP y DiBahP) no se detectan porque, en este caso, no se ha realizado el aumento final del flujo.

En lo que hace referencia a las condiciones de detección por fluorescencia, sólo se consideran las correspondientes al 5-metilcriseno, ya que el ciclopenta(cd)pireno no es fluorescente. Como el 5MeCry es equivalente al criseno pero con un grupo metilo en su estructura, que no hace variar sus propiedades de fluorescencia, las parejas de longitudes de onda propuestas para ambos compuestos coinciden [Tabla 32]. Como pareja de longitudes de onda principales se selecciona 296/405, ya incluida en la [Tabla 19]. Como pareja de longitudes de onda secundarias se selecciona 265/380, correspondiente a las longitudes de onda máximas de excitación y emisión halladas para este compuesto.

Tabla 32. Longitudes de onda de excitación y emisión seleccionadas para trabajar con criseno y 5-metilcriseno. Complementa la [Tabla 19].

| Compuesto (HAP) | Principal o de cuantificación | Secundaria o de cualificación |
|-----------------|------------------------------------------|-------------------------------|
| | $\lambda_{excitación}/\lambda_{emisión}$ | |
| Criseno | 296/405 | 265/380 |
| 5-metilcriseno | | |

2.4. MÉTODO CROMATOGRÁFICO GLOBAL POR HPLC-FLU PARA LA DETERMINACIÓN DE 24 HAPs (16+1 EPA-HAPs CON 15 SCF-HAPs).

En la [Tabla 33], se presentan las condiciones de separación propuestas para la determinación de los 24 HAPs a estudio. Se incluyen los 16 HAPs prioritarios para la EPA y los HAPs incluidos en la Recomendación de 2005/108/EC (prioritarios por la SCF con benzo(j)fluoranteno). En la [Tabla 34], se presentan los tiempos de retención relativos al BaP de todos los HAPs estudiados y las condiciones de detección de fluorescencia de cada uno de ellos.

Tabla 33. Condiciones de separación para la separación de 24 HAPs (16+1 EPA-HAPs+ 15 SCF-HAPs) por HPLC.

| Método global 24 HAPs – Condiciones de separación por HPLC | | | |
|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------|
| Columna | Pursuit 3 PAH (100 X 4,6 mm, 3 μm) | | |
| Volumen de inyección | 20 μL | | |
| Temperatura columna | 30°C | | |
| Flujo | 1,5 mL/min (inicial) | | |
| Eluyentes | [A] Agua MilliQ; [B] Acetonitrilo (ACN) | | |
| Gradiente de elución [sin DiBP] | 0 min: | [A] 48% [B] 52% | |
| | 5 min: | [A] 35% [B] 65% - Curva: 6 (lineal) | |
| | 9-16 min: | [A] 0% [B] 100% - Curva: 6 (lineal) | |
| | 16,5-19 min: | [A] 48% [B] 52% (Estabilización en condiciones iniciales) | |
| Gradiente de elución y de flujo [incluir DiB(ai)P y DiB(ah)P] | 0 min: | [A] 48% [B] 52% | F=1,5 mL/min |
| | 5 min: | [A] 35% [B] 65% - Curva: 6 (lineal) | F=1,5 mL/min |
| | 9 - 12 min: | [A] 0% [B] 100% - Curva: 6 (lineal) | F=1,5 mL/min |
| | 12,5 - 17 min: | [A] 0% [B] 100% - Curva: 6 (lineal) | F=2,0 mL/min |
| | 18-23 min: | [A] 48% [B] 52% | F=1,5 mL/min |
| Tiempo de cromatograma | 23 min | | |

Tabla 34. Método global 24 HAPs: Tiempos de retención relativos al BaP (trR (BaP)) y condiciones de detección de fluorescencia individuales.

| Compuesto (HAP) | Elución | Detección FLU ($\lambda_{excitación}/\lambda_{emisión}$) | |
|----------------------|-----------|------------------------------------------------------------|------------|
| | trR (BaP) | Principal | Secundaria |
| Naftaleno | 0,33 | 280/340 | --- |
| Acenaftileno | 0,40 | No fluorescente | |
| Acenafteno | 0,46 | 280/340 | --- |
| Fluoreno | 0,48 | 280/340 | --- |
| Fenantreno | 0,55 | 250/376 | --- |
| Antraceno | 0,62 | 250/376 | --- |
| Fluoranteno | 0,68 | 285/460 | --- |
| Pireno | 0,72 | 333/390 | --- |
| Ciclopenta(cd)pireno | 0,83 | No fluorescente | |
| Benzo(a)antraceno | 0,84 | 296/405 | 290/430 |
| Criseno | 0,86 | 296/405 | 250/376 |
| 5-metilcriseno | 0,89 | 296/405 | 250/376 |
| Benzo(j)fluoranteno | 0,91 | 318/500 | 380/500 |
| Benzo(e)pireno | 0,928 (*) | 314/380 | 250/376 |
| Benzo(b)fluoranteno | 0,933 (*) | 296/405 | 290/430 |
| Benzo(k)fluoranteno | 0,96 | 296/405 | 290/430 |

| Compuesto (HAP) | Elución | Detección FLU ($\lambda_{excitación}/\lambda_{emisión}$) | |
|----------------------|------------------|------------------------------------------------------------|-------------------|
| | <i>trR (BaP)</i> | <i>Principal</i> | <i>Secundaria</i> |
| Benzo(a)pireno | 1 | 296/405 | 290/430 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 1,03 | 296/405 | 285/400 |
| Dibenzo(al)pireno | 1,05 | 380/425 | 318/500 |
| Benzo(ghi)perileno | 1,09 | 296/405 | 285/400 |
| Indeno(123-cd)pireno | 1,10 | 318/500 | 293/485 |
| Dibenzo(ae)pireno | 1,15 | 360/390 | 318/500 |
| Dibenzo(ai)pireno | 1,45 | 380/425 | 318/500 |
| Dibenzo(ah)pireno | 1,55 | 290/430 | 318/500 |

(*) Se incluye una cifra significativa más en el trR (BaP) para indicar que BeP se eluye ligeramente por delante del BbF.

Con el método global puesto a punto, es posible la separación de los 24 HAPs a estudio en aproximadamente 23 min, a excepción del BeP y el BbF que se eluyen prácticamente al mismo tiempo de retención. Sin embargo, estos dos compuestos es posible determinarlos de forma independiente aprovechando la selectividad del detector de fluorescencia.

Hay que destacar que para el acenaftileno y el ciclopenta(cd)pireno aunque no son fluorescentes y no se podrían determinar con este detector, se han fijado sus tiempos de retención gracias al estudio llevado a cabo con el detector de ultravioleta (o DAD).

De los HAPs más pesados (a partir del BaA), se incluyen dos parejas de longitudes de onda de detección por fluorescencia que permitirán confirmar la identificación de estos compuestos, cuando se analizan muestras.

Justificación del orden de elución

Una vez conocido el orden de elución experimental de los 24 HAPs a estudio en la columna Pursuit 3 PAH (fase estacionaria polimérica C18), se quiere intentar justificar dicho orden en función de alguno de los parámetros estructurales de los compuestos. De esta manera, se podrá entender mejor el mecanismo de la separación de esta familia de compuestos en la columna utilizada.

A continuación se presenta una tabla resumen [Tabla 35] con los 24 HAPs a estudio en orden de elución experimental, junto a su masa molecular, número y tipo de anillos, además de un esquema de su estructura en función del número de anillos donde C6 representa a los anillos tipo benceno y C5 los anillos tipo penteno. El número de anillos de cada tipo se indica con un subíndice junto al tipo de anillo. Esta nomenclatura está aceptada por la IUPAC (IUPAC, 1998). Además, para entender la distribución espacial de los anillos se muestra una representación en 2D

Tabla 35. Estudio del orden de elución de los 24 HAPs en la columna Pursuit 3 HAP. Presentación de su orden de elución, estructura en función de la masa molecular, del número y tipo de anillos, además de la distribución espacial 2D de los anillos

| Orden Elución | Compuesto | MW | Nº átomos carbonos | Estructura | |
|---------------|----------------------|-----|--------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | | Nº anillos | 2D |
| 1 | Naftaleno | 128 | 10 | (C ₆) ₂ | C ₆ C ₆ |
| 2 | Acenaftileno | 152 | 12 | C ₅ ·(C ₆) ₂ | C ₅ C ₆ C ₆ |
| 3 | Acenafteno | 154 | 12 | C ₅ *·(C ₆) ₂ | C ₅ C ₆ C ₆ |
| 4 | Fluoreno | 166 | 13 | C ₅ ·(C ₆) ₂ | C ₆ C ₅ C ₆ |
| 5 | Fenantreno | 178 | 14 | (C ₆) ₃ | C ₆ C ₆ C ₆ |
| 6 | Antraceno | 178 | 14 | (C ₆) ₃ | C ₆ C ₆ C ₆ |
| 7 | Fluoranteno | 202 | 16 | C ₅ ·(C ₆) ₃ | C ₆ C ₆ C ₅ C ₆ |
| 8 | Pireno | 202 | 16 | (C ₆) ₄ | C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ |
| 9 | Ciclopenta(cd)pireno | 226 | 18 | C ₅ ·(C ₆) ₄ | C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ C ₅ |
| 10 | Benzo(a)antraceno | 228 | 18 | (C ₆) ₄ | C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ |
| 11 | Criseno | 228 | 18 | (C ₆) ₄ | C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ |
| 12 | 5-metilcriseno | 242 | 19 | (C ₆) ₄ -Me | C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ |
| 13 | Benzo(j)fluoranteno | 252 | 20 | C ₅ ·(C ₆) ₄ | C ₆ C ₆ C ₆ C ₅ C ₆ |
| 14 | Benzo(e)pireno | 252 | 20 | (C ₆) ₅ | C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ |
| 15 | Benzo(b)fluoranteno | 252 | 20 | C ₅ ·(C ₆) ₄ | C ₆ C ₆ C ₆ C ₅ C ₆ |
| 16 | Benzo(k)fluoranteno | 252 | 20 | C ₅ ·(C ₆) ₄ | C ₆ C ₆ C ₆ C ₅ C ₆ |
| 17 | Benzo(a)pireno | 252 | 20 | (C ₆) ₅ | C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ |
| 18 | Dibenzo(ah)antraceno | 278 | 22 | (C ₆) ₅ | C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ |
| 19 | Dibenzo(al)pireno | 302 | 24 | (C ₆) ₆ | C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ |
| 20 | Benzo(ghi)perileno | 276 | 22 | (C ₆) ₆ | C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ |
| 21 | Indeno(123-cd)pireno | 276 | 22 | C ₅ ·(C ₆) ₅ | C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ C ₅ C ₆ |
| 22 | Dibenzo(ae)pireno | 302 | 24 | (C ₆) ₆ | C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ |
| 23 | Dibenzo(ai)pireno | 302 | 24 | (C ₆) ₆ | C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ |
| 24 | Dibenzo(ah)pireno | 302 | 24 | (C ₆) ₆ | C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ C ₆ |

*no aromático – MW: masa molecular. Se marcan en color los que no siguen la secuencia.

Como se puede observar en la [Tabla 35], el orden de elución de los HAPs en la columna Pursuit 3 HAP, utilizando como fase móvil agua/acetonitrilo se puede describir en función de:

- El número de átomos de carbonos, es decir, los HAPs se eluyen de menor a mayor número de carbonos presentes en su estructura. En este caso, el único que no sigue la secuencia es el dibenzo(al)pireno, que se eluye antes de lo esperado.
- Su masa molecular, es decir, se eluyen en orden creciente de masas moleculares. Los HAPs que no siguen la secuencia son dibenzo(ah)antraceno y también el dibenzo(al)pireno, que se eluyen antes de lo esperado.
- El número de anillos (orden creciente) y a igual número de anillos, se eluyen antes los que incluyen anillos de 5 carbonos en su estructura. En este caso hay tres compuestos que no siguen la regla, el ciclopenta(cd)pireno, benzo(e)pireno e indeno(123-cd)pireno.

Y a igualdad de número de carbonos o de masa molecular o de número de anillos de 5 y 6 carbonos, el orden de elución viene determinado por su distribución espacial, es decir, los que presentan una forma más circular avanzan su posición teórica penetrando en la familia anterior.

En realidad, se supone que la descripción del orden de elución viene determinada por una combinación de todos estos factores. En el Capítulo II del presente trabajo, se estudia más detalladamente este efecto.

2.5. ESTUDIO DE PARÁMETROS DE RESPUESTA EN EL DETECTOR DE FLUORESCENCIA: LINEALIDAD Y LOD/LOQ. MÉTODO CROMATOGRÁFICO GLOBAL POR HPLC-FLU.

Con la finalidad de tener una valoración del método puesto a punto por HPLC-FLU que permita comparar los diferentes métodos cromatográficos para la determinación de HAPs, se decide considerar no sólo parámetros de separación sino también parámetros de respuesta en el detector de fluorescencia. Se propone estudiar la linealidad y los límites de detección y cuantificación, valorados con patrones. De esta manera, se podrá comparar tanto los rangos de trabajo como las concentraciones límite.

En este caso, para el método cromatográfica por HPLC-FLU, se inyectan en las condiciones cromatográficas del método global, 7 disoluciones conjuntas de HAPs preparadas en acetonitrilo de concentraciones comprendidas entre 5 ng/mL y 1000 ng/mL, para cada uno de los compuestos. Como condiciones de detección, se seleccionan las parejas de longitudes de onda principales de cada uno de los analitos y se trabaja con canales individuales (cuatro canales para cada uno de los métodos ensayados). La serie de patrones se inyecta por triplicado, en tres series independientes.

2.5.1. Estudio de linealidad.

La linealidad se estudia considerando como concentración mínima inyectada 5 ng/mL y 10 ng/mL. Se valora desde dos puntos de vista:

- *Ajuste por mínimos cuadrados.* Se incluyen las rectas de regresión para cada uno de los analitos. Como crítica del modelo de ajuste, se calculan los coeficientes de determinación (R^2) y se valora la homocedasticidad mediante la representación de los valores residuales⁷ relativos. Además, se valora la significación de los parámetros de las rectas de regresión, pendiente y ordenada en el origen, a partir de tests de *Student*.
- *Coefficiente de variación de los factores de respuesta:* con los que se valora la proporcionalidad de la respuesta. Se considera la tendencia gráfica de los factores de respuesta, el factor de respuesta promedio y su coeficiente de variación.

En las [Tabla 36], [Tabla 37] y [Tabla 38], se presentan los resultados del ajuste por mínimos cuadrados y de los factores de respuesta⁸, respectivamente, para cada uno de los HAPs estudiados, tanto en el rango de concentraciones de 5 a 1000 ng/mL como 10 a 1000 ng/mL. En el [Gráfico 3] y en el [Gráfico 4], se presenta la variación de los residuales relativos (%) a los dos rangos de concentraciones estudiados.

Tabla 36. Resultados del ajuste por mínimos cuadrados para los HAPs en un rango de 5 a 1000 ng/mL. Se incluyen tanto los coeficientes de determinación (R^2) como los intervalos de confianza (IC) de los parámetros de la recta, pendiente y ordenada en el origen.

| Compuesto | Recta regresión | | Crítica modelo | Valoración parámetros recta | | | |
|----------------------|------------------------|-----------------|----------------|-----------------------------|--------------|-----------------------|-----------|
| | Pendiente (área/ng/mL) | Ordenada (área) | | R^2 | IC pendiente | IC ordenada origen | |
| Naftaleno | 64978 | 94552 | 0,99994 | [64424, 65533] | √ | [-136536, 325642] | √ |
| Acenafteno | 259094 | 210165 | 0,99999 | [258017, 260172] | √ | [-238755, 659087] | √ |
| Fluoreno | 102432 | 220312 | 0,99992 | [101359, 103507] | √ | [-227225, 667850] | √ |
| Fenantreno | 72425 | 198703 | 0,99993 | [71712, 73139] | √ | [-98664, 496071] | √ |
| Antraceno | 236380 | 1631933 | 0,99950 | [230329, 242432] | √ | [-890000, 4153867] | √ |
| Fluoranteno | 100906 | 222294 | 0,99996 | [100136, 101676] | √ | [-98726, 543314] | √ |
| Pireno | 714191 | -17284, | 0,99994 | [707770, 720614] | √ | [-2693699, 2659130] | √ |
| Benzo(a)antraceno | 207794 | 1031318 | 0,99992 | [205721, 209869] | √ | [166899, 1895739] | X (12%)* |
| Criseno | 43945 | 206491 | 0,99992 | [43506, 44385] | √ | [23492, 389491] | X (11%)* |
| Benzo(j)fluoranteno | 56469 | -103325 | 0,99987 | [55719, 57221] | √ | [-416197, 209545] | √ |
| Benzo(e)pireno | 96031 | -109138 | 0,99994 | [95190, 96872] | √ | [-449297, 231020] | √ |
| Benzo(b)fluoranteno | 109962 | 374250 | 0,99996 | [109176, 110749] | √ | [46320, 702181] | X (8%)* |
| Benzo(k)fluoranteno | 1340374 | 5275728 | 0,99991 | [1325985, 1354763] | √ | [-721085, 11272542] | √ |
| Benzo(a)pireno | 755441 | 3458546 | 0,99994 | [748940, 761943] | √ | [749097, 6167995] | X (11%)* |
| Dibenzo(ah)antraceno | 405781 | 2697910 | 0,99974 | [398302, 413260] | √ | [-418834, 5814655] | √ |
| Dibenzo(al)pireno | 484777 | 107098 | 0,99999 | [485984, 488867] | √ | [-283317, 275446] | √ |
| Benzo(ghi)perileno | 178101 | 750232 | 0,99996 | [176749, 179453] | √ | [186705, 1313760] | X (-10%)* |
| Indeno(123-cd)pireno | 63065 | -223571 | 0,99989 | [62293, 63838] | √ | [-545478, 98335] | √ |
| Dibenzo(ae)pireno | 269167 | 500454 | 0,99849 | [265482, 275235] | √ | [-1348787, 2164244] | √ |
| Dibenzo(ai)pireno | 230921 | -334576 | 0,99998 | [233356, 238475] | √ | [-1784518, 255061] | √ |
| Dibenzo(ah)pireno | 1197322 | -13894403 | 0,99942 | [1157143, 1237338] | √ | [-42014358, 14397685] | √ |

(*) Relación entre la ordenada en el origen y la respuesta equivalente a un patrón de 100 ng/mL (orden de magnitud central del rango de concentraciones estudiado)

⁷ Residual: la diferencia entre el valor de respuesta asociada al ajuste por mínimos cuadrados y el resultado experimental.

⁸ Factor de respuesta: relación entre la concentración/área

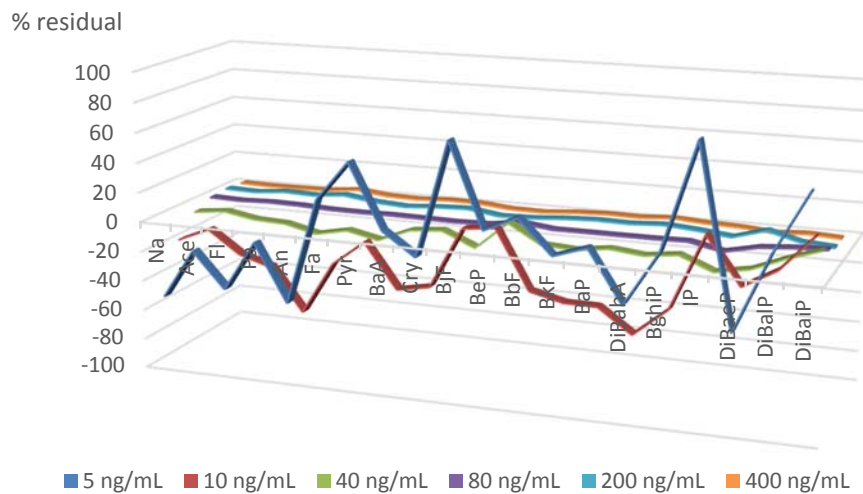


Gráfico 3. Gráfico de residuales relativos de cada uno de los HAPs (%) en las seis concentraciones más diluidas de la recta de regresión.

Tabla 37. Resultados de los factores de respuesta para los HAPs en un rango de 5 a 1000 ng/mL y 10 a 1000 ng/mL: promedio y coeficientes de variación.

| Compuesto | Rango: 5-1000 ng/mL FR (ng/mL/área) | | Rango: 10-1000 ng/mL FR (ng/mL/área) | | Rango: 10-1000 ng/mL 1/FR |
|----------------------|----------------------------------------|------|-----------------------------------------|------|------------------------------|
| | Promedio | CV% | Promedio | CV% | |
| Naftaleno | 1,58E-05 | 7,4 | 1,53E-05 | 2,2 | 65245 |
| Acenafteno | 3,86E-06 | 1,4 | 3,85E-06 | 0,9 | 259983 |
| Fluoreno | 9,70E-06 | 2,4 | 9,67E-06 | 2,5 | 103448 |
| Fenantreno | 1,31E-05 | 11,2 | 1,37E-05 | 2,5 | 73209 |
| Antraceno | 3,83E-06 | 13,3 | 4,02E-06 | 2,9 | 248821 |
| Fluoranteno | 9,23E-06 | 18,8 | 9,88E-06 | 1,9 | 101210 |
| Pireno | 1,34E-06 | 21,7 | 1,45E-06 | 5,1 | 691879 |
| Benzo(a)antraceno | 4,27E-06 | 20,6 | 4,59E-06 | 3,2 | 217893 |
| Criseno | 2,04E-05 | 16,4 | 2,17E-05 | 3,8 | 46245 |
| Benzo(j)fluoranteno | 1,73E-05 | 23,7 | 1,88E-05 | 6,6 | 53425 |
| Benzo(e)pireno | 1,06E-05 | 4,2 | 1,06E-05 | 4,2 | 94222 |
| Benzo(b)fluoranteno | 8,21E-06 | 21,5 | 8,88E-06 | 1,4 | 112674 |
| Benzo(k)fluoranteno | 6,82E-07 | 16,9 | 7,25E-07 | 1,6 | 1378954 |
| Benzo(a)pireno | 1,18E-06 | 20,1 | 1,27E-06 | 2,9 | 788979 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 2,18E-06 | 16,8 | 2,32E-06 | 3,7 | 431814 |
| Dibenzo(al)pireno | 2,01E-06 | 5,7 | 2,05E-06 | 0,9 | 487805 |
| Benzo(ghi)perileno | 5,03E-06 | 19,6 | 5,40E-06 | 2,6 | 185350 |
| Indeno(123-cd)pireno | 1,64E-05 | 21,9 | 1,76E-05 | 10,7 | 57500 |
| Dibenzo(ae)pireno | 3,65E-06 | 3,1 | 3,62E-06 | 2,9 | 275988 |
| Dibenzo(ai)pireno | 4,64E-06 | 8,9 | 4,51E-06 | 5,4 | 221729 |
| Dibenzo(ah)pireno | 9,46E-07 | 8,9 | 9,384E-07 | 9,8 | 1065643 |

Tabla 38. Resultados del ajuste por mínimos cuadrados para los HAPs en un rango de 10 a 1000 ng/mL. Se incluyen tanto los coeficientes de determinación (R^2) como los intervalos de confianza (IC) de los parámetros de la recta, pendiente y ordenada en el origen.

| Compuesto | Recta regresión | | Crítica modelo | Valoración parámetros recta | | | |
|----------------------|------------------------|-----------------|----------------|-----------------------------|--------------|----------------------|---|
| | Pendiente (área/ng/mL) | Ordenada (área) | | R^2 | IC pendiente | IC ordenada origen | |
| Naftaleno | 64919 | 136563 | 0,99995 | [64275, 65563] | √ | [-153403, 426529] | √ |
| Acenafteno | 258997 | 279149 | 0,99999 | [257713, 260281] | √ | [-298844, 857142] | √ |
| Fluoreno | 102343 | 284042 | 0,99992 | [101052, 103634] | √ | [-297259, 865344] | √ |
| Fenantreno | 72407 | 211707 | 0,99992 | [71509, 73305] | √ | [-192658, 616071] | √ |
| Antraceno | 236013 | 1892388 | 0,99948 | [228555, 243470] | √ | [-1464614, 5249390] | √ |
| Fluoranteno | 101001 | 155409 | 0,99996 | [100132, 101869] | √ | [-235537, 546355] | √ |
| Pireno | 715699 | -1084837 | 0,99998 | [711655, 719744] | √ | [-2905490, 735816] | √ |
| Benzo(a)antraceno | 207861 | 984219 | 0,99992 | [205257, 210466] | √ | [-188265, 2156703] | √ |
| Criseno | 43933 | 215611 | 0,99992 | [43381, 44485] | √ | [-32895, 464117] | √ |
| Benzo(j)fluoranteno | 56644 | -226372 | 0,99996 | [56151, 57136] | √ | [-448009, 4735] | √ |
| Benzo(e)pireno | 96054 | -125135 | 0,99994 | [95001, 97107] | √ | [-585339, 335069] | √ |
| Benzo(b)fluoranteno | 110080 | 290763 | 0,99997 | [109252, 110909] | √ | [-82316, 663842] | √ |
| Benzo(k)fluoranteno | 1340437 | 5230949 | 0,99990 | [1322242, 1358633] | √ | [-2959618, 13421515] | √ |
| Benzo(a)pireno | 755720 | 3261087 | 0,99994 | [747602, 763839] | √ | [-393269, 6915442] | √ |
| Dibenzo(ah)antraceno | 405389 | 2975820 | 0,99973 | [396110, 414667] | √ | [-1200890, 7152530] | √ |
| Dibenzo(al)pireno | 484769 | 109124 | 0,99999 | [485379, 489900] | √ | [-595044, 44173] | √ |
| Benzo(ghi)perileno | 178176 | 697154 | 0,99995 | [176502, 179850] | √ | [-56312, 1450621] | √ |
| Indeno(123-cd)pireno | 63250 | -354086 | 0,99997 | [62789, 63711] | √ | [-761750, 46421] | √ |
| Dibenzo(ae)pireno | 268482 | 686251 | 0,99835 | [264098, 276243] | √ | [-1836159, 28887] | √ |
| Dibenzo(ai)pireno | 231038 | -369664 | 0,99998 | [233033, 239189] | √ | [-2226028, 423285] | √ |
| Dibenzo(ah)pireno | 1201024 | -18215361 | 0,99943 | [1148482, 1253566] | √ | [-58702408, 222716] | √ |

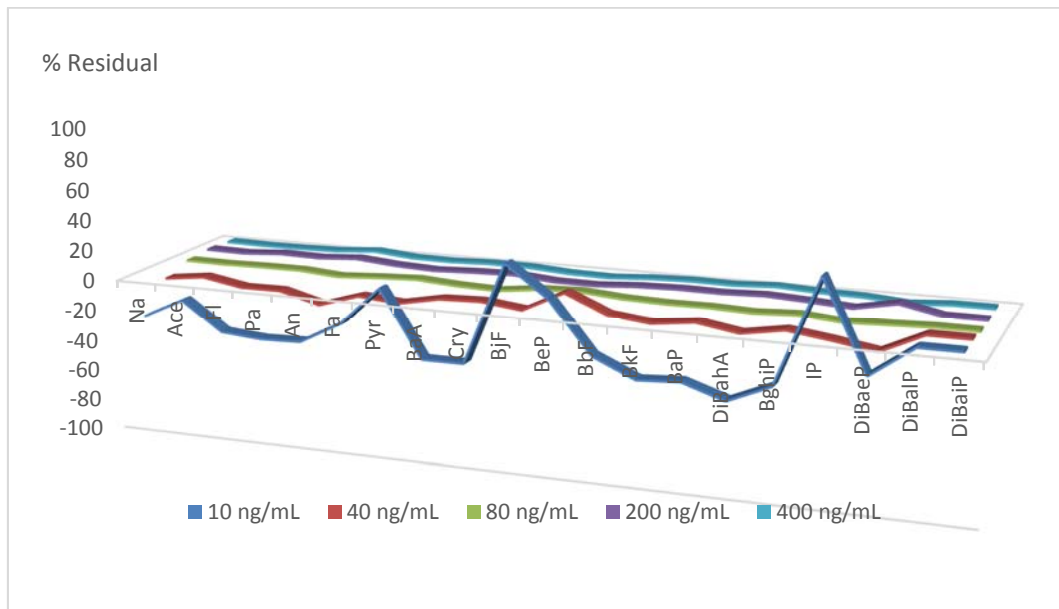


Gráfico 4. Ajuste mínimos cuadrados rango 10-1000 ng/mL. Gráfico de residuales relativos de cada uno de los HAPs (%) en las cinco concentraciones más diluidas de la recta de regresión.

Del estudio de la linealidad de los HAPs en el método cromatográfico global por HPLC-FLU, en los rangos de concentraciones que cubren hasta dos órdenes de magnitud considerando como concentración mínima 5 o 10 ng/mL, se puede concluir que:

- Según los resultados que se obtienen del ajuste por mínimos cuadrados tanto cuando la concentración inferior es 5 ng/mL como 10 ng/mL, se observa que, para todos los HAPs los coeficientes de determinación (R^2) son superiores a 0,990, asegurando que los datos experimentales se ajustan al modelo lineal escogido.
- Si se consideran los parámetros de las rectas obtenidas (pendiente y ordenada en el origen):
 - Todas las pendientes obtenidas son significativamente diferentes de cero, tal y como indican sus intervalos de confianza, donde en ningún caso se incluye el valor cero.
 - Las ordenadas en el origen son estadísticamente igual a cero para todos los analitos, es decir, su intervalo de confianza incluye el cero, cuando el rango de concentraciones de estudio se reduce de 10 a 1000 ng/mL. Cuando el rango se amplía y se inicia en 5 ng/mL, en algunos casos esto no se cumple [Tabla 36]. Aunque hay que destacar que, en todos estos casos donde no se cumple que la ordenada en el origen es estadísticamente igual a cero, ésta es inferior o igual al 10% de la respuesta del analito a concentración de 100 ng/mL (concentración central del rango estudiado). Así, que se podría considerar que estas ordenadas no iguales a cero, no son significativas.
- En lo que hace referencia al estudio de residuales, se obtienen valores altos a las concentraciones más bajas de estudio, de manera que trabajar con rectas de calibrado (concentración vs. Área) y cuantificar concentraciones bajas, tendrá mucho error asociado. Aunque hay que destacar que cuando la concentración mínima se aumenta a 10 ng/mL estos valores residuales se reducen sustancialmente.
- Cuando se valora la proporcionalidad de la respuesta con el estudio del coeficiente de variación de los factores de respuesta, se prefiere trabajar con un rango de concentraciones de 10 a 1000 ng/mL, ya que se consigue que, en todos los casos el CV% obtenido sea inferior o igual al 10%. Con lo que se consideraría adecuado trabajar con el promedio de factores de respuesta cuando se calculan concentraciones en muestra.

Así, cuando se trabaja con HAPs con HPLC-FLU, se prefiere reducir el rango de concentraciones de trabajo de 10 a 1000 ng/mL, para todos los compuestos. Si se quiere ampliar el límite bajo a 5 ng/mL, se debería utilizar un patrón de concentración cercana para la cuantificación de las muestras más diluidas.

2.5.2. Estudio de las concentraciones límite (LOD/LOQ).

Con el estudio de los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), se pretende determinar la concentración límite a la que se podría trabajar con patrones, en lo que hace referencia a la concentración de HAPs inyectada con el método de HPLC propuesto.

Para ello, se realiza un cálculo teórico de los límites de detección/cuantificación a partir del estudio de la relación señal/ruido del patrón de concentración más baja de la recta de calibrado, siguiendo la [Ecuación 2]:

$$\begin{aligned} \text{LOD ó LOQ} &= K \cdot \text{Ruido} \cdot \left(\frac{\text{Concentración}}{\text{Señal}} \right)_{\text{patrón referencia}} \\ &= K \cdot \frac{\text{Concentración}_{\text{patrón referencia}}}{S/R} \end{aligned}$$

Ecuación 2. Cálculo de la concentración teórica del LOD/LOQ a partir de la relación señal/ruido

Donde,

LOD/LOQ: concentración en ng/mL en el límite de detección o en el límite de cuantificación.

K⁹: constante igual a 3 cuando se calcula el LOD e igual a 10 cuando se calcula el LOQ.

Ruido (R): corresponde a la desviación estándar del blanco que en este caso se calcula gráficamente como altura máxima del ruido en una zona cercana al pico a estudio.

Señal (S): corresponde a la altura del pico de analito a la concentración de referencia.

Concentración patrón de referencia: corresponde a los ng/mL de cada uno de los HAPs del patrón utilizado como referencia para el cálculo del LOD y LOQ. Este debe de ser cercano a estos valores límites para poder asegurar linealidad de la respuesta.

En la [Tabla 39], se presentan las concentraciones límite (LOD/LOQ) para cada uno de los HAPs a estudio.

Tabla 39. Concentraciones límite (LOD/LOQ) para los HAPs a estudio en el método cromatográfico global por HPLC-FLU. Naranja: LOQ>5 ng/mL; Gris: 5< LOQ<1 ng/mL; Negro: LOQ< 1 ng/mL.

| Compuesto | Concentración patrón referencia (ng/mL) | Señal/Ruido | LOD (ng/mL) | LOQ (ng/mL) |
|---------------------|-----------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Naftaleno | 5,3 | 8 | 2,0 | 6,7 |
| Acenafteno | 5,3 | 28 | 0,6 | 1,9 |
| Fluoreno | 5,3 | 10 | 1,6 | 5,3 |
| Fenantreno | 5,3 | 15 | 1,1 | 3,5 |
| Antraceno | 5,3 | 60 | 0,3 | 0,9 |
| Fluoranteno | 5,3 | 22 | 0,7 | 2,4 |
| Pireno | 5,3 | 47 | 0,3 | 1,1 |
| Benzo(a)antraceno | 5,3 | 62 | 0,3 | 0,8 |
| Criseno | 5,3 | 11 | 1,4 | 4,7 |
| Benzo(j)fluoranteno | 5,5 | 8 | 2,2 | 7,3 |

⁹ K es el valor de la constante que se establece para poder asegurar un margen de confianza que no haga incurrir en falsos positivos con una determinada seguridad. El factor multiplicativo de 3 (LOD) corresponde a un riesgo de 7% de obtener un falso positivo, mientras que el factor de 10 (LOQ) asegura no incurrir a falsos positivos con una probabilidad superior al 0,1%. (Krull & Swattz, 1998)

| Compuesto | Concentración patrón referencia (ng/mL) | Señal/Ruido | LOD (ng/mL) | LOQ (ng/mL) |
|----------------------|-----------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Benzo(e)pireno | 5,1 | 8 | 1,9 | 6,4 |
| Benzo(b)fluoranteno | 5,3 | 17 | 0,9 | 3,1 |
| Benzo(k)fluoranteno | 5,3 | 468 | 0,03 | 0,1 |
| Benzo(a)pireno | 5,3 | 253 | 0,1 | 0,2 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 5,3 | 125 | 0,1 | 0,4 |
| Dibenzo(al)pireno | 2,5 | 50 | 0,2 | 0,5 |
| Benzo(ghi)perileno | 5,3 | 53 | 0,3 | 1,0 |
| Indeno(123-cd)pireno | 5,3 | 13 | 1,2 | 4,1 |
| Dibenzo(ae)pireno | 4,6 | 30 | 0,4 | 1,5 |
| Dibenzo(ai)pireno | 5,0 | 28 | 0,5 | 1,8 |
| Dibenzo(ah)pireno | 8,3 | 14 | 1,8 | 5,9 |

Como se puede observar en la [Tabla 39], las concentraciones límites expresadas como LOQ para la mayoría de los HAPs estudiados se encuentran entre 1 y 5 ng/mL (\approx el 50%). Los HAPs que tienen LOQ teóricos superiores a 5 ng/mL son naftaleno, fluoreno, benzo(j)fluoranteno, benzo(e)pireno y dibenzo(ah)pireno. En estos casos se podría decir que su concentración límite sería aproximadamente 10 ng/mL.

Estos resultados son coherentes con los obtenidos en el estudio de linealidad donde se ha comprobado que aunque se podría trabajar a concentración de 5 ng/mL, se prefiere subir el límite bajo a 10 ng/mL, en la mayoría de los casos.

3. MÉTODO 2: HRGC-MS.

La cromatografía de gases con detector espectrómetro masas es, junto con HPLC-FLU, la otra técnica cromatográfica propuesta para el análisis de HAPs. Así, en esta tesis, se optimiza un procedimiento para el análisis de los 24 HAPs a estudio por HRGC-MS como alternativa al método cromatográfico ya optimizado por HPLC-FLU. Igual que se ha realizado por cromatografía líquida, se trabajará primero con los 16 EPA-HAPs y con el benzo(j)fluoranteno, y, posteriormente, se incluirán el benzo(e)pireno, ciclopenta(cd)pireno, 5-metilcriseno y los cuatro isómeros del dibenzopireno.

Cuando se plantea la utilización de HRGC-MS en lugar de HPLC-FLU, a priori, se presenta como principal ventaja, la posibilidad de confirmar la identificación de los picos llevada a cabo por tiempos de retención, con su espectro de masas (o la relación de las abundancias de los iones característicos si se trabaja en modo SIM (*Selected Ion Monitoring*)). Como principales problemas, se puede destacar la baja volatilidad de los compuestos más pesados y la separación de los isómeros como BjF, BkF y BbF, entre otros.

En la optimización del método cromatográfico por HRGC-MS se trabaja, indistintamente, con los dos equipos disponibles en la Sección de Cromatografía. Se utilizan dos equipos de *Agilent Technologies*, ambos son cromatógrafos de gases tipo HP-6890 acoplados a un espectrómetro de masa, uno tipo HP-5973 *inert* y el otro, HP-5975B. Los dos espectrómetros de masas cuentan, únicamente, con ionización por impacto electrónico y analizador de iones tipo cuadrupolo simple. Las diferencias entre ambos equipos son mínimas, por lo que se considerarán de funcionamiento equivalente. Para el tratamiento de la información, ambos equipos disponen del software *MSD Chemstation* (D.03.00.611), también de *Agilent Technologies*. Para la identificación de los compuestos por espectro de masas, los equipos cuentan con la biblioteca *NIST* en su versión 2.0 (julio de 2002).

Como punto de partida para la determinación de los 16+1 EPA-HAPs (16 EPA-HAPs con BjF), se propone trabajar con una columna capilar de tipo HP5-MS (30 m X 0,25 mm X 0,25 µm) y helio como gas portador. Es una columna capilar de fase estacionaria apolar, tipo 5%fenil-95%metilsilicona. Las dimensiones propuestas, son habituales para trabajar por HRGC-MS con flujos de gas portador del orden de 1 mL/min.

En la [Tabla 40], se presentan las condiciones cromatográficas iniciales propuestas en este estudio para la determinación de los 16 EPA-HAPs y el BjF por HRGC-MS (EI).

Tabla 40. Condiciones cromatográficas iniciales para la separación de los 16+1 EPA-HAPs por HRGC-MS.

| Método cromatográfico inicial. Separación 16+1 EPA-HAPs por HRGC-MS | |
|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Columna | HP5-MS (30m X 0,25 mm x 0,25 µm) |
| Gas portador | Helio |
| Inyección | Modo: <i>Splitless</i> (Purge flow: 60 mL/min) Temperatura: 300°C Volumen inyección: 2 µL Liner: <i>liner</i> recto Septum: <i>Non-stick Long-life</i> |
| Programa de temperatura | Temperatura inicial: 80°C durante 3,10 min Programa: de 80°C a 190°C (20°C/min) hasta 300°C (3°C/min) |
| Modo de trabajo | Flujo constante de 1,7 mL/min |
| Línea de transferencia | Temperatura: 315°C |
| Detección | Modo de ionización: Impacto electrónico a 70 eV Temperatura de la fuente de iones: 230°C Temperatura del cuadrupolo (Selector de iones): 150°C Detección en modo SIM |
| Tiempo de cromatograma | 40 min |

En la [Figura 16], se presenta el monitograma obtenido al analizar un patrón de 1000 ng/mL de los 16 EPA-HAPs con BfJ, en las condiciones cromatográficas descritas en la [Tabla 40]. El patrón se prepara en acetona a partir de la disolución conjunta PAH MIX 9 y el estándar sólido de BfJ.

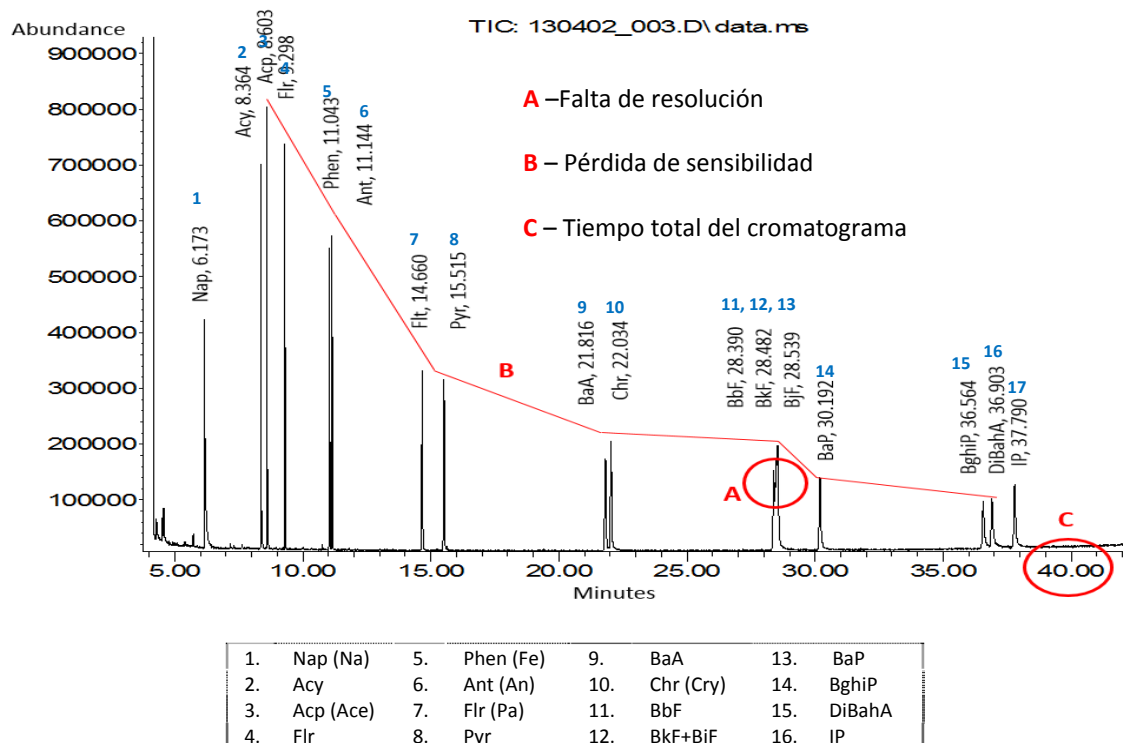


Figura 16. Monitograma del patrón de 1000 ng/mL de los 16 EPA-HAPs con BfJ analizado con el método de partida por HRGC-MS

Como se puede observar en la [Figura 16], el método cromatográfico inicial propuesto por HRGC-MS (EI) para la determinación de HAPs presenta tres puntos críticos:

- Falta de eficacia y resolución. Este efecto se hace evidente en la zona del monitograma que corresponde a la separación de los isómeros BbF, BkF y BjF (marcado en la [Figura 16] como zona A). Estos tres isómeros, cuando se analizan con una columna HP5 presentan un tiempo de retención similar y, teniendo en cuenta que sus fragmentaciones y sus abundancias relativas en sus espectros de masas son prácticamente idénticas, son difíciles de diferenciar. Por lo tanto, mejorar la resolución de estos tres isómeros es objetivo principal para la optimización del método cromatográfico.
- Pérdida de sensibilidad. Se observa una pérdida de sensibilidad progresiva para los compuestos menos volátiles que supone un aumento en su límite de detección y cuantificación. Este efecto se presenta en la [Figura 16] en forma de líneas rectas que unen los máximos de los picos, observándose pendientes negativas en todos los casos. La causa principal de este problema es que la baja presión de vapor de los HAPs más pesados provoca que puedan condensar en algunas de las zonas del equipo, antes de llegar al detector, provocando un claro efecto de discriminación.
- Tiempo total del cromatograma. En estas condiciones cromatográficas el último de los HAPs a estudio (IP) se eluye con un tiempo de retención de 38 min.

Así, los objetivos principales de la optimización del método cromatográfico para la determinación de los HAPs por HRGC-MS (EI), se centraran en mejorar la resolución de los isómeros (principalmente del grupo BbF, BkF y BjF), disminuir el problema de pérdida de sensibilidad para los compuestos más pesados y reducir el tiempo total del cromatograma. Se debe tener en cuenta que el método cromatográfico 15+1 EPA-HAPs puesto a punto por HPLC-FLU, consigue separar este grupo de isómeros y el tiempo de retención del IP es de unos 11 min.

3.1. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE DETECCIÓN MS

La detección en el espectrómetro de masas se realiza en modo SIM (*Selected Ion Monitoring*), es decir, se seleccionan dos iones característicos de cada uno de los compuestos. Se selecciona un ion de cuantificación (*target*) y uno de identificación (*qualifier*). La relación entre la respuesta obtenida de ambos iones (*target* respecto a *qualifier*) permite la confirmación del pico identificado por tiempo de retención.

Para seleccionar los iones característicos de cada uno de los compuestos, ha sido necesario estudiar sus espectros de masas, inyectando tanto patrones conjuntos como individuales de cada uno de los HAPs en modo SCAN (barrido de masas). Como ion de cuantificación se ha seleccionado, en todos los casos, el pico base del espectro de masas. Mientras como ion identificador, se ha seleccionado el segundo ion más abundante de mayor relación masa/carga (m/z) posible.

En la [Tabla 41] se presentan los 24 HAPs a estudio según orden de elución, con sus masas moleculares y los iones que se proponen para trabajar en modo SIM. Así, se especifica tanto el ion de cuantificación (*target*) como el identificador (*qualifier*), además de la relación de respuesta que existe entre ambos iones y que permitirá la confirmación del pico identificado por tiempo de retención.

Tabla 41. Listado de los 24 HAPs a estudio. Se incluyen sus masas moleculares y sus iones característicos para la detección en modo SIM y la relación de abundancias entre ambos: Ion de cuantificación (target) y de identificación (qualifier).

| Compuesto | MM | Iones m/z (modo SIM) | | |
|----------------------|-----|----------------------|-----------|-------------------------------------|
| | | Target | Qualifier | Relación de abundancias entre iones |
| Naftaleno | 128 | 128 | 102 | 7,0 |
| Acenaftileno | 152 | 152 | 151 | 17,6 |
| Acenafteno | 154 | 153 | 152 | 51,4 |
| Fluoreno | 166 | 166 | 165 | 100,6 |
| Fenantreno | 178 | 178 | 176 | 22,6 |
| Antraceno | 178 | 178 | 176 | 23,3 |
| Fluoranteno | 202 | 202 | 200 | 20,5 |
| Pireno | 202 | 202 | 200 | 18,1 |
| Benzo(a)antraceno | 228 | 228 | 226 | 25,9 |
| Ciclopenta(cd)pireno | 226 | 226 | 224 | 22,4 |
| Criseno | 228 | 228 | 226 | 31,6 |
| 5-metilcriseno | 242 | 242 | 241 | 56,1 |
| Benzo(b)fluoranteno | 252 | 252 | 250 | 22,3 |
| Benzo(k)fluoranteno | 252 | 252 | 250 | 23,5 |
| Benzo(j)fluoranteno | 252 | 252 | 250 | 28,0 |
| Benzo(a)pireno | 252 | 252 | 250 | 25,0 |
| Benzo(e)pireno | 252 | 252 | 250 | 32,0 |
| Benzo(ghi)perileno | 276 | 276 | 274 | 22,6 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 278 | 278 | 276 | 52,0 |
| Indeno(123-cd)pireno | 276 | 276 | 274 | 22,5 |
| Dibenzo(al)pireno | 302 | 302 | 300 | 49,6 |
| Dibenzo(ae)pireno | 302 | 302 | 300 | 24,6 |
| Dibenzo(ai)pireno | 302 | 302 | 300 | 19,0 |
| Dibenzo(ah)pireno | 302 | 302 | 300 | 19,5 |

Como se puede observar en la [Tabla 41], prácticamente todos los iones de cuantificación (*target*) tienen una relación m/z que coincide con el ion molecular del compuesto (M), excepto para el acenafteno que coincide con el M-1 (ya que es el único que tiene dos carbonos sp³). Esto indica que son compuestos de estructura muy rígida y que su ionización no conlleva una pérdida de masa, ya que, en todos los casos, corresponde con el pico base del espectro de masas. En lo que hace referencia al ion de identificación, en la mayoría de los casos, coincide con el ion *pseudomolecular* (M-1) o con en el M-2, a excepción del caso del naftaleno. Éste es el HAP más

pequeño por lo que se ha tenido que escoger un ion de m/z más pequeña (con relación más baja) que puede llevar a tener más problemas de interferencias.

En lo que hace referencia a los isómeros del antraceno (An, Fe), del pireno (Pa, Pyr), del benzoantraceno (BaA, Cry), del benzo(a)fluoranteno y benzo(a)pireno (BbF, BkF, BeP y BaP), del benzo(a)perileno (BghiP, DiBaH) o los isómeros del dibenzopireno (DiB(al)P, DiB(ae)P, DiB(ai)P, DiB(ah)P), los iones escogidos coinciden y su relación de respuesta entre iones es muy parecida (excepto en este último grupo, la relación de abundancias para el DiB(al)P). Esto indica que la diferencia entre los espectros de masas es mínima, por lo que su identificación se ha realizado por tiempos de retención, mediante la inyección de los compuestos individuales.

3.2. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA LA SEPARACIÓN DE LOS 24 HAPs A ESTUDIO POR HRGC-MS (EI).

Teniendo en cuenta los problemas que se han presentado al analizar los 16+1 EPA-HAPs por HRGC-MS con las condiciones cromatográficas iniciales, las fases de optimización del método cromatográfico se centrarán en los siguientes puntos:

1. Optimización de la selectividad/eficacia/resolución y tiempo total del cromatograma:
 - a. Estudio tipo de columna
 - b. Optimización del programa de temperaturas
 - c. Optimización de la presión de trabajo

2. Optimización de la sensibilidad:
 - a. Optimización de la temperatura de la fuente de iones
 - b. Optimización de la temperatura de la línea de transferencia
 - c. Optimización de la inyección: volumen de inyección, temperatura de inyección, tipo de *liner* y modo de inyección

3.2.1. Optimización de la selectividad/eficacia/resolución y tiempo de cromatograma.

3.2.2. Optimización del tipo de columna.

En el método cromatográfico inicial propuesto para la determinación de los 16+1 EPA-HAPs por HRGC-MS, se propone trabajar con una columna capilar HP5-MS (5%fenil-95%metilpolisiloxano). Ésta es una de las fases estacionarias más comunes utilizadas en cromatografía de gases. Esta fase estacionaria apolar permite la separación de la mayoría de los 16 EPA-HAPs aunque presenta ligeros problemas de separación en los siguientes grupos de compuestos: BaA-Cry; BbF-BkF-BjF; IP-DiBaH.

Además, si se amplia el conjunto de HAPs a estudio a los 24 propuestos, se debe de tener en cuenta que el ciclopenta(cd)pireno tiene una masa molecular y un punto de ebullición parecido al del BaA y Cry, por lo que se pueden tener problemas en la separación de este trio de compuestos. También se quiere incluir el BeP, que puede eluirse junto a sus isómeros, el BaP y el grupo de los benzofluorenos.

Además, se quieren separar los isómeros del dibenzopireno. Estos compuestos, además de ser isómeros tienen una masa molecular elevada (302 uma) y son muy poco volátiles, por lo que su determinación puede ser complicada.

Para escoger la columna de trabajo, se realiza un estudio bibliográfico de las columnas que se proponen para la separación de esta familia de compuestos. En la [Tabla 42], se incluyen las columnas halladas. Se incluyen en todos los casos, la aplicación para que están propuestas, la composición de su fase estacionaria, la polaridad de la fase, el rango de temperaturas de trabajo y la información encontrada en lo que hace referencia a la separación de las parejas críticas de compuestos.

Tabla 42. Columnas propuestas para el análisis de HAPs. Estudio bibliográfico.

| Propiedades | Columnas | | | | |
|----------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------------------------|
| | (HP) 5MS | (VF)-17MS PAH | (DB)-EUPAH | SELECT PAH | CP-SIL PAH |
| Casa comercial | Agilent | Agilent (Varian) | Agilent | Agilent | Agilent (Varian) |
| Aplicación propuesta | General | EU y EPA-HAPs | EU HAPs | Multi HAPs | C5-C80, PAH y compuestos polares |
| Composición de la fase estacionaria | 5%fenil 95%metil polisiloxano | 50%fenil 50%metil polisiloxano | Fase registrada Agilent | Fase registrada Agilent | Fase registrada Crosslinked silicon Agilent |
| Polaridad | Baja | Media | Media | Media | Baja |
| Rango de temperaturas de trabajo (°C) | -60-325/350 | 40-325/350 | 40-320/340 | 40-325/350 | 40-400/425 |
| Sangrado | Bajo | Bajo | Muy bajo | Bajo | Bajo |
| Separación compuestos críticos | | | | | |
| ¹⁾ BaA-Cry-CP(cd)P | ¹⁾ KO | ¹⁾ OK | ¹⁾ OK | ¹⁾ OK | ¹⁾ KO |
| ²⁾ ISO benzofluoranteno | ²⁾ KO | ²⁾ OK | ²⁾ OK | ²⁾ OK | ²⁾ KO |
| ³⁾ IP-DiBahA | ³⁾ OK | ³⁾ OK | ³⁾ OK | ³⁾ OK | ³⁾ OK |
| ⁴⁾ ISO dibenzopireno | ⁴⁾ OK | ⁴⁾ OK | ⁴⁾ OK | ⁴⁾ OK | ⁴⁾ Sin información |
| Otras características | --- | --- | Usual: alta resolución | Nota 1 | Columna de alta resistencia a la rotura |
| Referencias bibliográficas | --- | (Heijnsdijk, 2010) | (Lynam, 2012) | (Agilent, 2010) | (Varian) |

*ISO: isómeros

NOTA 1: La columna SELECT PAH además permite la separación de los siguientes compuestos no incluidos en el estudio de la presente tesis: dentro del grupo BaA-Cry-CP(cd)P, el trifenileno [m/z=226 y 228]; de los isómeros del benzofluoranteno incluye el BaF; dentro del grupo de IP y DiBahA también separa al benzo(b)trifenileno [m/z 276 y 278].

De las columnas propuestas en bibliografía, en la presente tesis, se propone trabajar con la columna de fase estacionaria tipo VF17 MS *for PAH*. Es una columna de polaridad media, a la que el 50% de grupos fenilo de su fase estacionaria, le proporcionan una selectividad basada en las interacciones π/π . De esta manera, se consiguen separar las parejas críticas de los compuestos a estudio. Cabe destacar también, su bajo sangrado y su temperatura máxima elevada que permitirá la elución de compuestos con baja volatilidad.

Con la finalidad de reducir al máximo posible el tiempo de cromatograma, se cambian las dimensiones de la columna. Se propone trabajar con una columna capilar con un diámetro interno reducido (inferior o igual a 150 μm) de manera que se trabajará dentro del campo de la cromatografía de gases ultrarrápida (*Fast GC*). Cabe destacar, que la ganancia en velocidad es inversamente proporcional al diámetro de la columna utilizada. El utilizar este tipo de columnas capilares, mejora el tiempo total de cromatograma. Sin embargo, estas columnas suelen tener un fino espesor de fase (en este caso, de 0,05 μm), que conlleva a una disminución de la capacidad de carga de la columna. Así, para conseguir picos estrechos y no desdoblados, es imprescindible reducir el volumen de inyección. En lo que hace referencia a los requerimientos instrumentales, el uso de columnas capilares ultrarrápidas, supone una mayor caída de presión, por lo que se requiere, que el cromatógrafo utilizado pueda fijar y mantener presiones en cabeza de columna elevadas. En este caso, el equipo de gases utilizado (*Agilent 6890*) puede soportar hasta 60 psi. Además, para reducir esta caída de presión, generalmente, las columnas capilares ultrarrápidas suelen ser más cortas. Así, la columna capilar propuesta es una VF17-MS (20 m X 0,15 mm X 0,05 μm).

Con esta nueva columna para la separación de los HAPs, se decide seguir utilizando helio como gas portador. Se podría pensar en utilizar hidrógeno. Éste tiene mejores propiedades como gas portador ya que, su menor viscosidad permite trabajar con caudales superiores sin afectar negativamente a la eficacia. De esta manera, es posible obtener tiempos de análisis más cortos. Sin embargo, se desestima este cambio ya que, a pesar de sus mejores propiedades como gas portador el es altamente inflamable y en la Sección de Cromatografía no se tiene la costumbre de utilizar, especialmente, cuando se trabaja con detector masas.

Para tener métodos equivalentes con los que se puedan comparar resultados a nivel de selectividad, se decide realizar una transferencia a partir del método ya ensayado [Tabla 40]. Se tiene en cuenta la geometría de la columna y se aprovecha el software *GC Method Translator* disponible en la web oficial de *Agilent*. En la transferencia de método, el software propone trabajar con flujo constante de 1,02 mL/min pero para evitar superar la presión máxima de trabajo del equipo cuando la temperatura del programa aumenta, se decide trabajar a presión constante de 30 psi.

En la [Figura 17] se presentan, los resultados obtenidos con las dos columnas, con la finalidad de comprobar la diferencia de selectividad. En ambos casos, se trabaja con un *liner* recto y se inyecta 1 μ L de un patrón de los 16 EPA-HAPs con B_jF de 1000 ng/mL preparado en acetona.

Como se puede observar, la columna VF-17MS ofrece una resolución muy superior entre las parejas críticas. Así, con la nueva columna propuesta los isómeros del benzofluoranteno se separan con una resolución de 1,5 (B_bF-B_kF) y 1,4 (B_kF-B_jF), respectivamente.

Además, el hecho de realizar la transferencia a una columna más corta (de 30 m a una de 20 m) permite acortar el tiempo de cromatograma hasta la mitad (de 40 min a 20 min, aproximadamente).

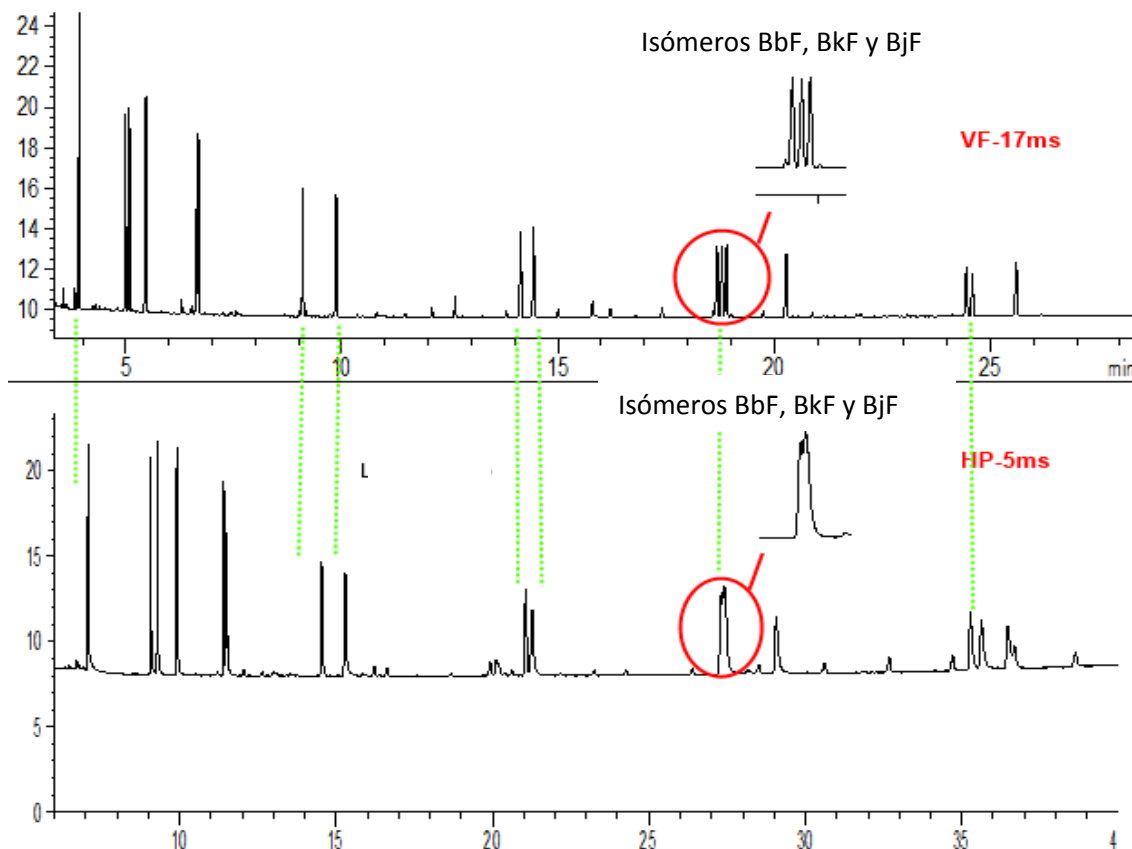


Figura 17. Superposición de los cromatogramas obtenidos con la columna VF17MS (20 m X 0,15 mm X 0,05 μ m)- [Superior] y con la columna HP5MS (30 m X 0,25 mm X 0,25 μ m) - [Inferior].

3.2.3. Optimización del programa de temperaturas.

La optimización del programa de temperaturas se realiza inicialmente para los 16 EPA-HAPs con BjF. Posteriormente, se aplica a los nuevos compuestos 5-metilcriseno, ciclopenta(cd)pireno, benzo(e)pireno y los cuatro isómeros del dibenzopireno.

Primero se estudia la temperatura mínima de inicio del programa para conseguir una mejora de eficacia de los picos por efecto de trampa fría. Las temperaturas iniciales que se han considerado son 60°C, 80°C, 100°C, 150°C, 190°C, 220°C i 260°C. Los resultados se presentan en la [Figura 18]. Cabe destacar, que este estudio se ha realizado con la columna HP5MS. Los resultados corresponden a un patrón conjunto de los 16 EPA-HAPs con BjF de 1000 ng/mL del que se inyectan 2 µL en modo splitless. El programa de temperaturas corresponde al que se incluye en la [Tabla 40] pero modificando la temperatura inicial.

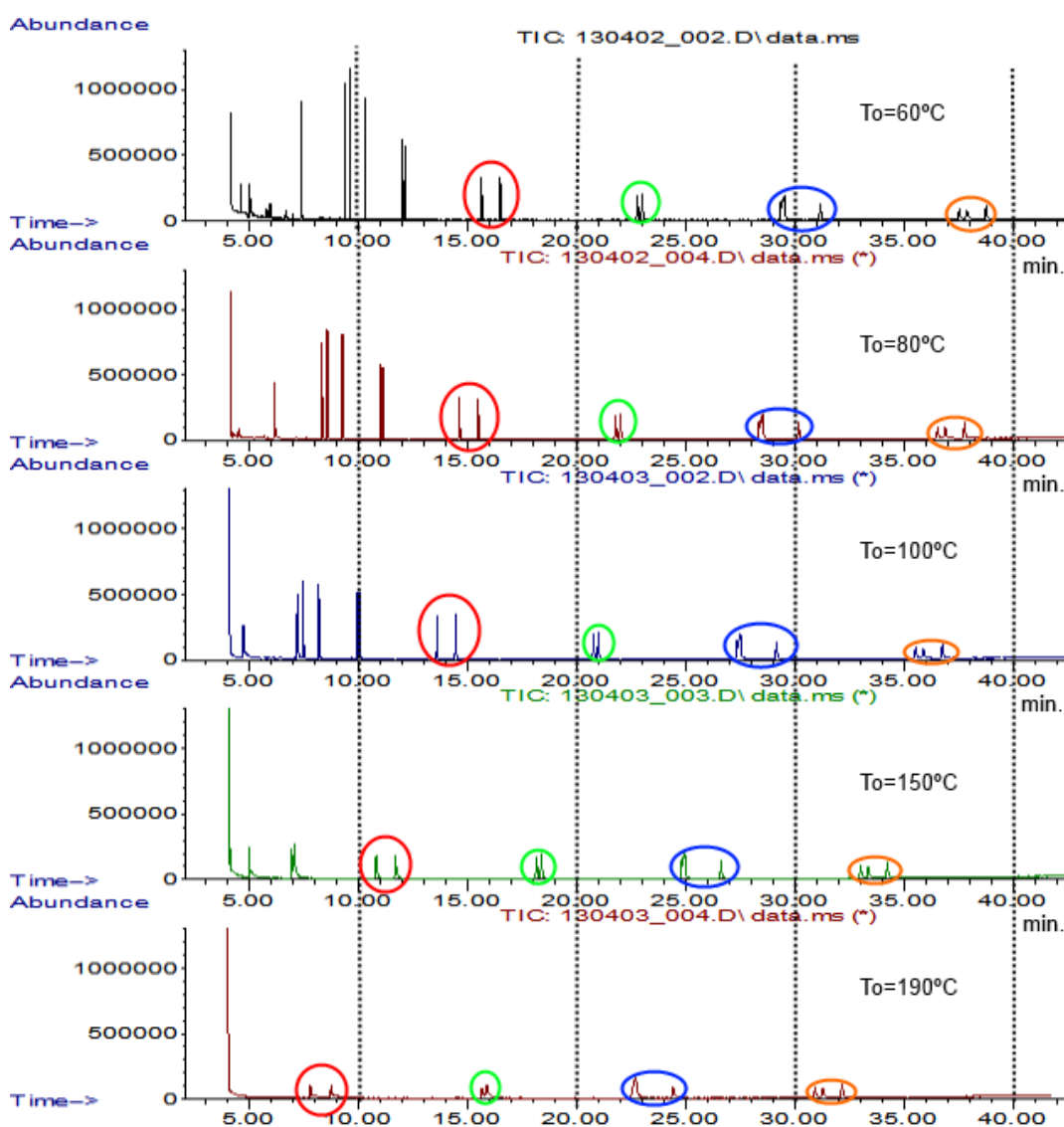


Figura 18. Estudio de la variación de la temperatura inicial (T_0) del programa de temperaturas. De arriba abajo, se corresponde con T_0 60°C, 80°C, 100°C, 150°C y 190°C. Patrón de 1000 ng/mL 16 EPA-HAPs con BjF preparado en acetona. Resto de condiciones cromatográficas incluidas en la [Tabla 40].

Como se puede observar en la [Figura 18], al aumentar la temperatura inicial del programa, además de una reducción evidente de los tiempos de retención de los picos, se observa una pérdida de eficacia para los compuestos más volátiles. Esto se debe, a que se elimina el efecto de la trampa fría para los compuestos más volátiles, de manera que estos compuestos no quedan bien retenidos en la cabeza de la columna en la etapa inicial isoterma del programa de temperaturas. Sin embargo, el efecto de la trampa fría no afecta a los HAPs menos volátiles.

Así, cuando se trabaja con acetona como disolvente, la temperatura inicial del programa puede ser de unos 60°C, para asegurar la correcta reconcentración por efecto de trampa fría del naftaleno (HAP más volátil).

Sin embargo, se ha comprobado, que cuando se trabaja con tolueno como disolvente del patrón, al ser menos volátil que la acetona, la temperatura inicial del cromatograma no puede ser tan baja. Si se fija en 60°C, el tolueno condensa de forma no uniforme en las primeras espiras de la columna provocando un desdoblamiento de los picos de los compuestos más volátiles por un mal efecto solvente. Para evitar este problema, basta con aumentar la temperatura inicial a 80°C. De esta manera, se consigue eliminar totalmente el efecto solvente del tolueno. Por el contrario, el naftaleno queda peor retenido, ya que para él se pierde parte del efecto de la trampa fría. A los otros compuestos prácticamente no les afecta. En la [Figura 19], se presenta el resultado de este efecto.

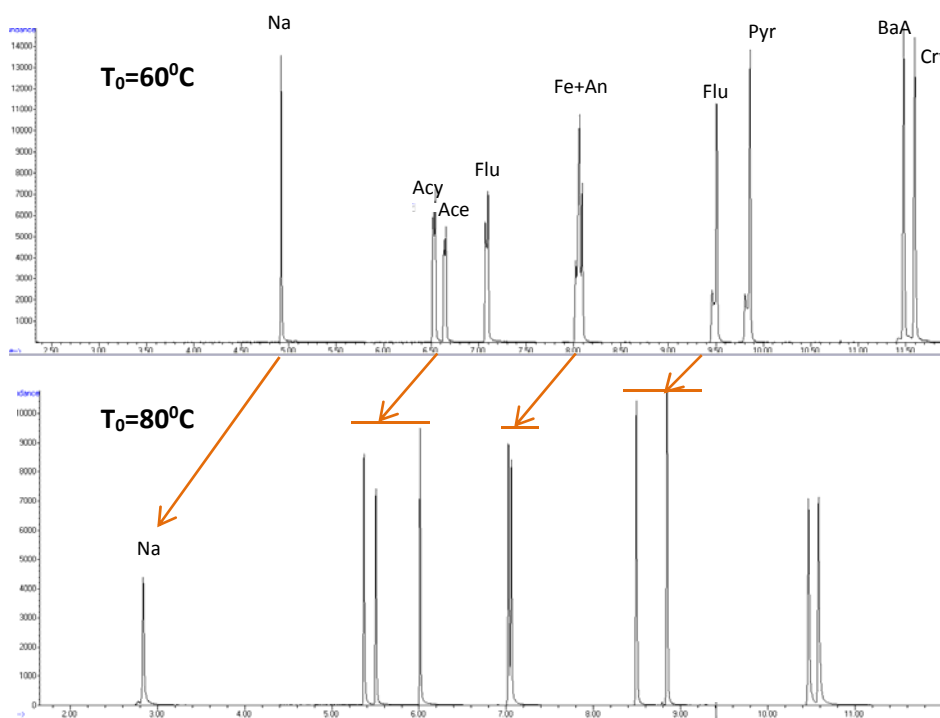


Figura 19. Ejemplo del problema de efecto solvente del tolueno a temperatura inicial no suficientemente baja. Patrón conjunto de HAPs de 200 ng/mL preparado en tolueno.

Una vez fijada la temperatura inicial ($T_0 = 60^\circ\text{C}$ cuando se trabaja con acetona como disolvente; $T_0=80^\circ\text{C}$ si se trabaja con tolueno), se procede a optimizar el programa de temperaturas con la columna VF17MS. En este caso, la optimización se realiza utilizando acetona como disolvente y con un patrón de los 16 EPA-HAPs con B_jF. En la [Figura 20], se incluyen los diferentes programas ensayados.

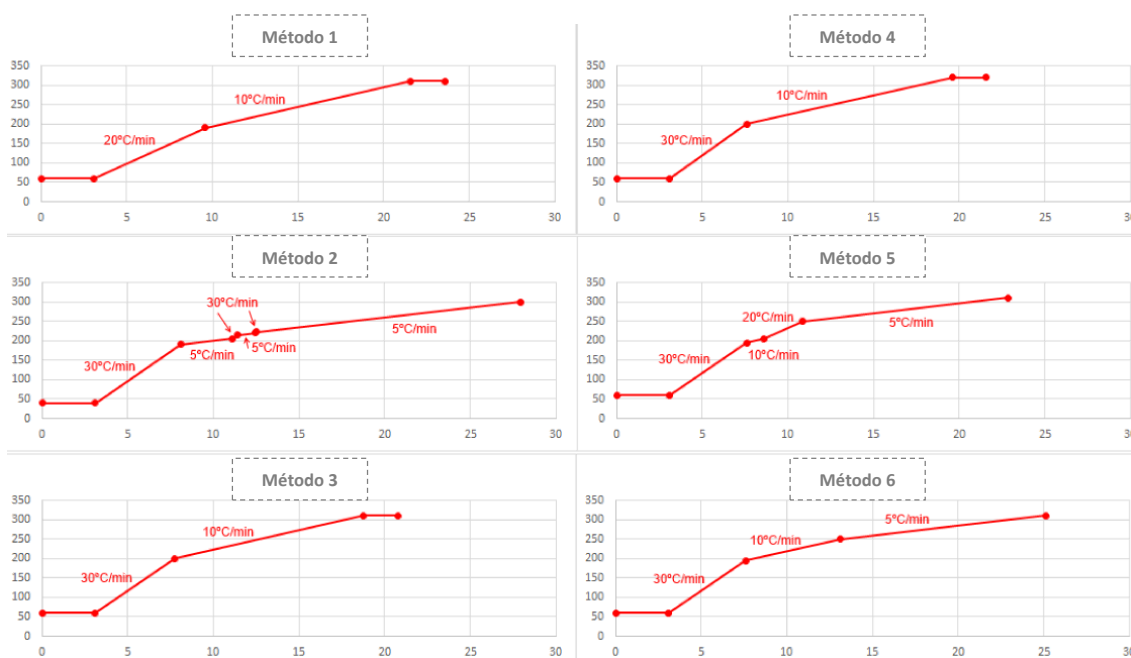


Figura 20. Programas de temperaturas ensayados para la separación de los 16 EPA-HAPs con B_jF.

Para comparar los resultados obtenidos, se considera la resolución entre los picos de B_{ghi}P y DiBaH_A, la respuesta relativa del BaP (compuesto volatilidad baja) respecto a la del acenaftileno (compuesto volátil) y el tiempo total del cromatograma [Figura 21].

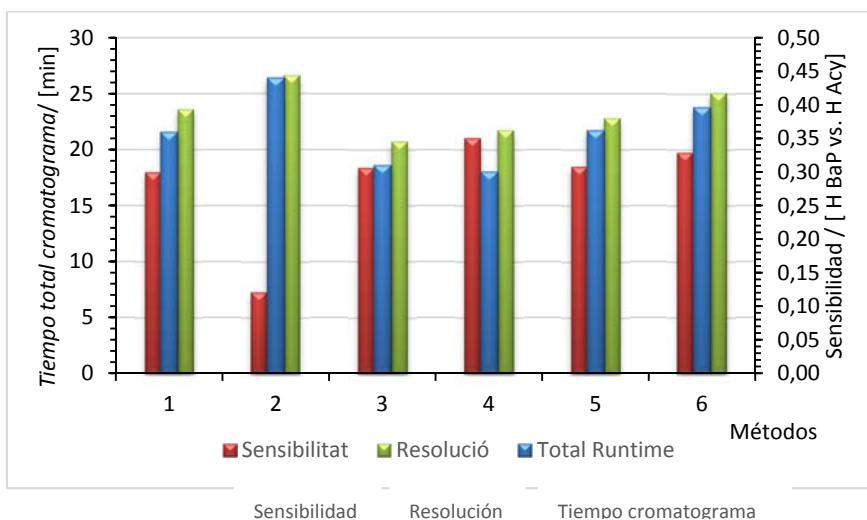


Figura 21. Resultados obtenidos del estudio de los programas de temperaturas ensayados. Valoración de la sensibilidad (% respuesta BaP vs Acy), la resolución entre B_{ghi}P e IP y el tiempo total del cromatograma.

Como se puede observar en la [Figura 21], excepto el método 2 de la [Figura 20] que presenta una sensibilidad muy baja los otros métodos ensayados presentan unos resultados de sensibilidad, resolución y tiempo total de cromatograma muy parecidos. Pero teniendo en cuenta que se busca mayor sensibilidad y resolución, y menor tiempo de cromatograma, el método más equilibrado es el que le corresponde el programa de temperaturas número 5.

Así, el programa de temperaturas propuesto es el siguiente: 60°C (3,1 min) – 30°C/min hasta 195°C - 10°C/min hasta 205°C- 20°C/min hasta 250°C- 5°C/min hasta 310°C.

En estas condiciones, el IP (el HAP más pesado de los 16 EPA-HAPs), se eluye a un tiempo de retención de unos 20 min. De manera que se ha conseguido reducir a la mitad el tiempo de cromatograma que se tenía en condiciones iniciales.

Para aplicar el programa de temperaturas a los 24 HAPs a estudio, se propone simplemente aumentar el tiempo final en que el programa trabaja a temperatura de 310°C. De esta manera, se consiguen eluir los compuestos más pesados, es decir, los cuatro isómeros del dibenzopireno, sin perder resolución de los otros compuestos a estudio.

Por otro lado, los cuatro isómeros del dibenzopireno se eluyen después del IP y se separan entre sí. Para poder determinar su orden de elución, ha sido necesario inyectar patrones individuales de cada uno de los isómeros.

El ciclopenta(cd)pireno se eluye entre benzo(a)antraceno y criseno con una resolución suficiente ya que, aunque se solapa parcialmente con el criseno, sus iones característicos son diferentes. Por otro lado, el 5-metilcriseno y el benzo(e)pireno no presentan problemas de separación ya que se eluyen después del criseno y el benzo(a)pireno, respectivamente, con resoluciones superiores a 1,5.

3.2.4. Optimización de la presión de trabajo.

La presión de trabajo ha de permitir trabajar en una zona de buena eficacia para los picos en el menor tiempo posible. Debido a que se trabaja con una columna capilar ultrarrápida, se desestima la posibilidad de trabajar a flujo constante, para evitar que el equipo no soporte la subida de presión al aumentar la temperatura a lo largo del programa. Así, se propone trabajar a presión contante.

Para determinar la presión óptima de trabajo se realizan dos inyecciones de un patrón de 500 ng/mL de BaP a diferentes presiones: 20 psi, 25 psi, 30 psi, 37 psi, 40 psi, 45 psi, 50 psi, 53 psi y 60 psi (presión máxima que suministra el equipo). Las inyecciones se realizan en modo isoterma a 230°C

En la [Figura 22], se presentan los cromatogramas obtenidos a las diferentes presiones ensayadas.

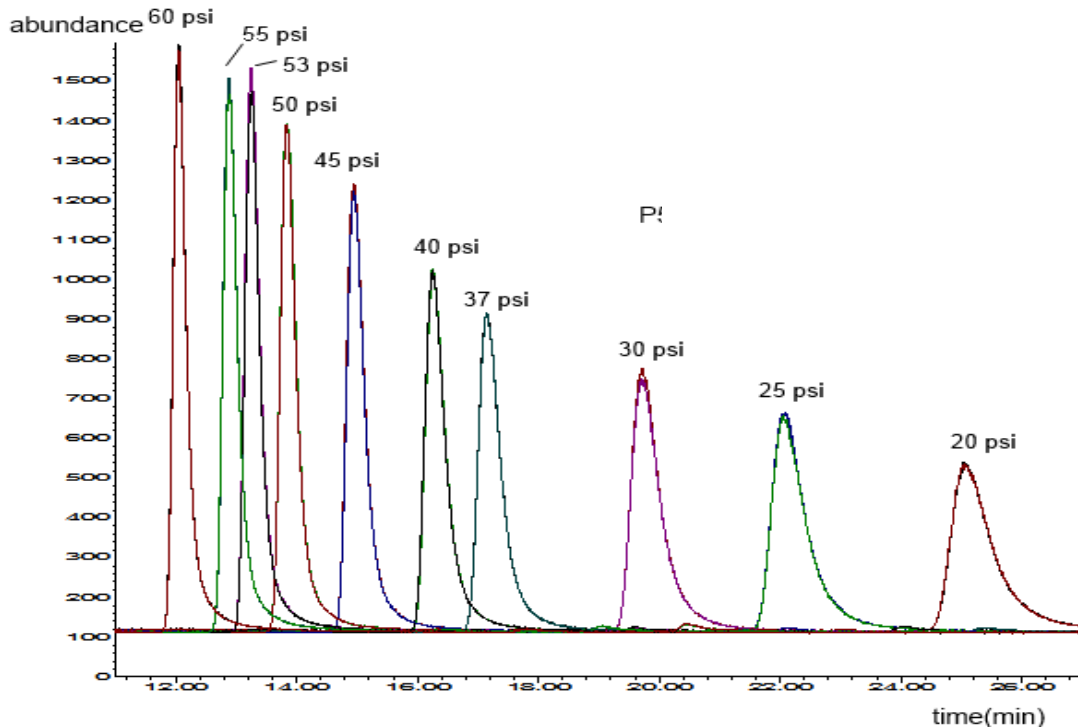


Figura 22. Superposición de los cromatogramas obtenidos a diferentes presiones. Patrón BaP (500 ng/mL en acetona) inyección de 1 μ L (split 5:1) en la columna VF-17Ms.

Como se puede observar, al aumentar la presión de trabajo disminuye tanto el tiempo de retención del pico de BaP como su anchura. Para determinar la presión óptima de trabajo, se recorre a la ecuación de Van Deemter. El resultado se presenta en la [Figura 23].

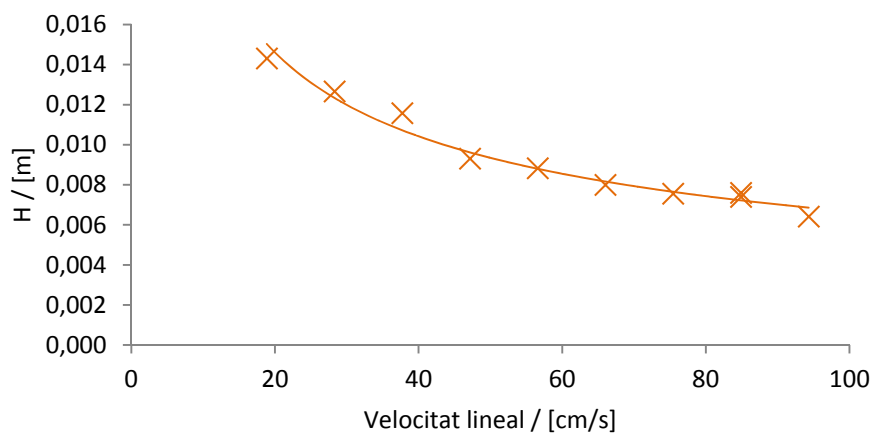


Figura 23. Representación de la altura equivalente de plato teórico (H), respecto a la velocidad lineal (cm/s). Ecuación de Van Deemter.

Los resultados obtenidos a 60 psi (velocidad lineal de 94 cm/s), se consideran fuera de la tendencia. Esto puede ser debido a que es una presión próxima a la presión máxima de trabajo del equipo y éste no es realmente capaz de mantenerla. Así, se observa que a medida que aumenta la velocidad lineal (aumenta la presión de trabajo), la eficacia del método mejora ya que disminuye la altura equivalente de plato teórico.

A partir de unos 57 cm/s (equivalente a 40 psi), se observa una mejora significativa aunque la presión óptima no se consigue localizar ya que el equipo disponible no permite trabajar a mayores presiones. Así, se fija como presión de trabajo 40 psi.

3.2.5. Optimización de la sensibilidad.

Uno de los principales problemas que se han observado en el método cromatográfico inicial, es la pérdida clara de sensibilidad progresiva para los compuestos menos volátiles debido a que condensan en alguno de los puntos del equipo antes de llegar al detector.

Por esta razón, se decide estudiar a fondo los tres puntos del equipo que en los que se considera más probable que pueda producirse esta condensación: la línea de transferencia, la fuente de iones del detector y el inyector.

3.2.6. Optimización de la temperatura de la línea de transferencia.

La línea de transferencia es una de las zonas propicias para darse la condensación de los analitos menos volátiles, aspecto que se traduciría en la pérdida de señal ya que el analito de estudio no llegaría al detector. El hecho de aumentar la temperatura de la línea de transferencia puede solucionar el problema de discriminación. El único limitante lo marca la temperatura máxima de trabajo de la columna, ya que, cabe destacar, que la temperatura de la línea de transferencia es a la que se mantienen los últimos centímetros de la columna durante el tiempo que el método cromatográfico esté cargado en el equipo.

Se ensayan diferentes temperaturas de la línea de transferencia: 310°C, 320°C, 330°C, 340°C i 350°C.

En la [Figura 24], se presentan las alturas de acenafteno (volatilidad alta), benzo(a)pireno (volatilidad media) e indeno(123-cd)pireno (volatilidad baja) frente a las diferentes temperaturas de la línea de transferencia ensayadas. En todos los casos, se inyecta un patrón conjunto de los 16 EPA-HAPs de 1000 ng/mL, preparado en acetona. Se inyecta 1 µL en modo splitless en la columna VF17MS.

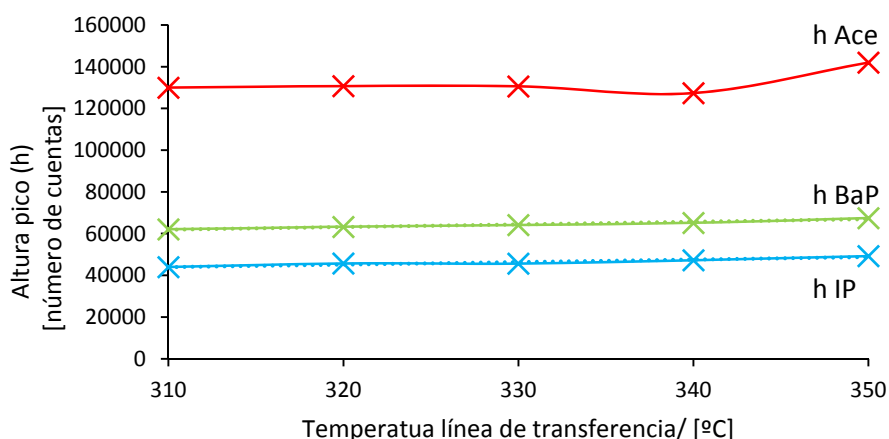


Figura 24. Evolución de la altura de los picos de acenafteno (Ace), benzo(a)pireno (BbP) e indeno(123-cd)pireno (IP) en función de la temperatura de la línea de transferencia.

Como se puede observar, aumentar la temperatura de línea de transferencia no supone cambios significativos en la altura, ni de los compuestos más volátiles ni en la de los menos volátiles, por lo que no es la responsable de la pérdida de sensibilidad para los compuestos pesados. Aun así, como la intensidad de la señal mejora globalmente, se propone trabajar a temperaturas altas de la línea de transferencia.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que como la temperatura máxima de la columna cuando se está en condiciones isoterma es de 325°C, se prefiere trabajar a esta temperatura de la línea de transferencia. Aunque, con la finalidad de aumentar la vida de la columna, se propone bajar la temperatura de la línea de transferencia a 300°C mientras el equipo está en *standby*.

3.2.7. Optimización de la temperatura de la fuente de iones del detector.

La fuente de iones es el primer elemento del detector espectrómetro de masas con el que se encuentran los compuestos que provienen de la columna, después de haber pasado por la línea de transferencia. Es donde se produce la ionización y fragmentación de los compuestos antes de ser focalizados y seleccionados por el analizador de iones para pasar al detector.

La temperatura de la fuente de iones marca las condiciones en las que se da la ionización y generalmente, es uno de los parámetros fijados por el propio fabricante. En este caso, los equipos utilizados trabajan habitualmente a una temperatura de la fuente de iones de 230°C (equipo *Agilent 5973 inert*) y 250°C (equipo *Agilent 5975B*). Las temperaturas máximas de trabajo de las fuentes de iones indicadas por el fabricante son 300°C y 350°C, respectivamente para los dos equipos disponibles.

Para cada temperatura de la fuente de iones que se quiera utilizar, es necesario realizar un calibrado previo del equipo (AUTOTUNE) donde se fijará la nueva temperatura de la fuente de iones. Una temperatura de ionización demasiado baja, puede provocar problemas de

sensibilidad para los compuestos más pesados, debido a que condensan en la misma fuente de iones.

Se propone ensayar diferentes temperaturas de la fuente de iones: 230°C (temperatura habitual), 250°C, 260°C, 270°C, 285°C y 300°C. No se sube la temperatura a 350°C aunque el modelo 5975B de *Agilent* lo permite, para poder trabajar indistintamente con los dos equipos disponibles. En la [Figura 25], se presentan los resultados obtenidos al analizar un patrón de 1000 ng/mL de los 16 EPA-HAPs.

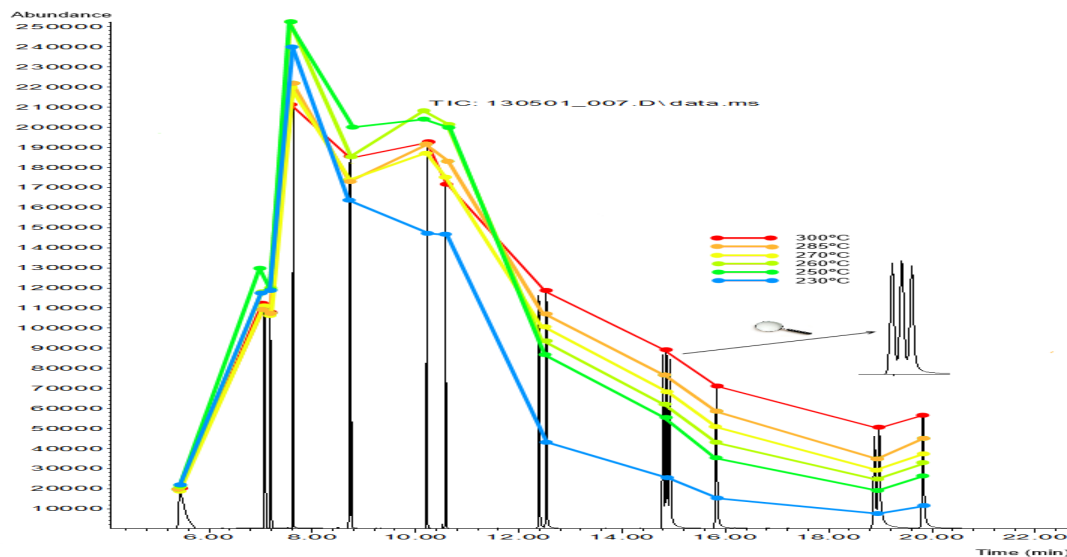


Figura 25. Efecto del cambio de la temperatura de la fuente de iones para cada uno de los compuestos incluidos en el patrón 16 EPA-HAPs con B_JF (1000 ng/mL).

Cada línea de diferente color, une los máximos de los picos del cromatograma a una determinada temperatura de la fuente de iones. Para poder sacar conclusiones se divide el cromatograma en dos zonas: antes y después de los 11 minutos.

Para los picos que se eluyen antes del minuto 11, es difícil establecer una única tendencia y la variabilidad observada puede ser debido a una falta de la repetibilidad de inyección. Sin embargo, para los picos más pesados que se eluyen después de los 11 minutos la tendencia es clara. Cuanto mayor es la temperatura de la fuente de iones mayor es la altura del pico. Esto centra el problema de la falta de sensibilidad para los compuestos más pesados en la temperatura de la fuente de iones del detector MS. Se puede decir, que aunque existe una temperatura habitual de trabajo para la fuente de iones propuesta por el fabricante, ésta no es adecuada cuando se trabaja con compuestos de baja volatilidad. Estos compuestos pesados que eluyen en forma gaseosa a través de la columna, condensan justo antes de llegar a la fuente de iones, si su temperatura no es suficientemente elevada.

Con la finalidad de visualizar de forma numérica el efecto de la variación de la temperatura de la fuente de iones, se amplía la zona del cromatograma donde se eluyen los isómeros del benzofluoranteno y en la que se eluyen BghiP-DiBaH-A-IP, y se normalizan las alturas obtenidas a las diferentes temperaturas ensayadas, considerando el 100% la altura máxima (máxima temperatura).

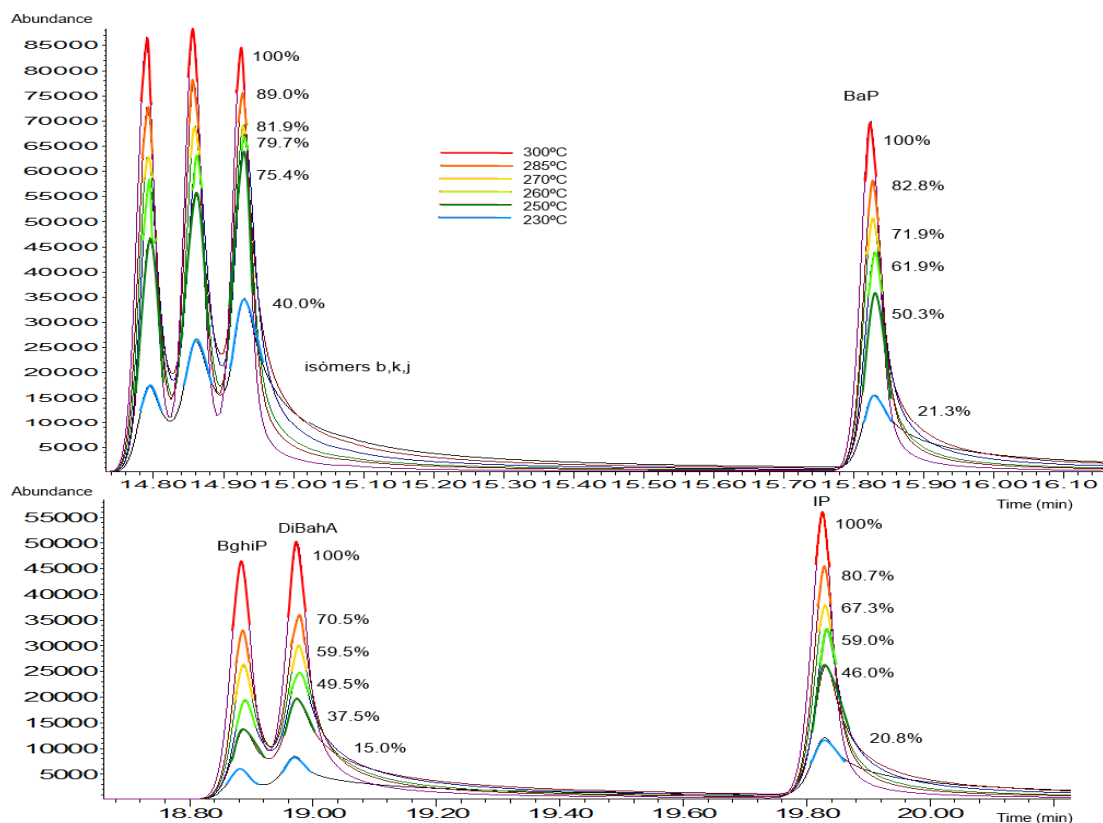


Figura 26. Alturas relativas de los diferentes picos de los HAPs pesados a estudio en función de la temperatura de la fuente de iones.

Como se puede observar, para los compuestos más pesados, al aumentar la temperatura de la fuente de iones aumenta de forma muy notable la altura del pico. En el caso de los isómeros del benzofluoranteno, el aumento se traduce en un poco más del doble de la señal (factor de 2,5). En el caso del BaP, la señal casi se quintuplica (factor de 4,7) y en el caso del DiBahA se sextuplica (factor de 6,6).

Además, el aumentar la temperatura de la fuente de iones no sólo permite mejorar la sensibilidad para los compuestos más pesados, sino que también mejora la simetría de los picos, disminuyendo considerablemente la cola del pico. Esto permite mejorar la eficacia y, en consecuencia, la resolución.

Queda claro que el aumento de la temperatura de la fuente de iones ha generado la mejora más significativa en lo que hace referencia a la optimización de la señal de los compuestos más pesados. Sin embargo, se está limitado a las características instrumentales, ya que se tiene una temperatura máxima de trabajo de la fuente de iones. Sería interesante disponer de nuevos equipos que permitieran aumentar la temperatura de la fuente de iones lo suficiente para poder trabajar con los HAPs más pesados. Así, se fija la temperatura de la fuente de iones en 300°C.

3.2.8. Optimización de la inyección.

A pesar de que se ha conseguido mejorar mucho la sensibilidad para los compuestos más pesados con el aumento de la temperatura de la fuente de iones, se decide estudiar también como afecta la inyección. Cabe destacar que el inyector es el primer punto donde se produce la discriminación de los compuestos que inician su elución a través de la columna. Es fundamental que todos los compuestos a estudio se sometan a las mismas condiciones de homogenización, vaporización e introducción dentro de la columna independientemente de su masa molecular. Las variables del inyector que se han considerado son el volumen de inyección, la temperatura del inyector, el tipo de *liner* y la relación de *splitter*.

El **volumen de inyección** está limitado a la capacidad de carga de la columna. Se propone trabajar con sólo 1 µL de volumen inyectado, ya que si se inyecta el doble de volumen se observa la aparición de colas por delante de los primeros compuestos eluidos. Esto es debido a que el espesor la fase estacionaria de la columna (0,05 µm) no es suficiente para retener la cantidad inyectada. Sin embargo, en el caso de los compuestos más pesados, no se observa este efecto. Se aprecia un incremento de su altura, aproximadamente proporcional al volumen inyectado.

La **temperatura del inyector** corresponde a la temperatura a la que se realiza la vaporización de la muestra. A priori, un aumento de la temperatura del inyector está ligado con un aumento de la sensibilidad para los compuestos de menor presión de vapor. Para comprobarlo se han ensayado temperaturas de 280°C, 290°C, 300°C, 310° y 325°C. Cabe destacar, que al aumentar la temperatura del inyector, aumenta el volumen que ocupa la muestra una vez vaporizada y éste está limitado al volumen del *liner* utilizado. En este caso, los ensayos se han realizado con un *liner* tipo *focus liner*® (volumen 930 µL)

En la [Tabla 43], se muestra la altura relativa del BaP y el IP respecto al acenaftileno como indicador de la relación de sensibilidad entre los compuestos poco volátiles y los volátiles. También se incluye la resolución entre BghiP e IP, parámetro representativo de las colas de los picos, ya que éstas harían perder la resolución entre esta pareja crítica de compuestos.

Tabla 43. Estudio de la influencia de la temperatura del inyector. Altura relativa del pico de BaP e IP respecto al Ace. Resolución entre los picos de BghiP y DiBahA.





| Parámetros | Temperatura del inyector | | | | |
|-------------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 280°C | 290°C | 300°C | 310°C | 325°C |
| Altura relativa (BaP/Ace) [%] | 48% | 50% | 51% | 49% | 49% |
| Altura relativa (IP/Ace) [%] | 24% | 29% | 34% | 35% | 35% |
| RS _{BghiP, DiBahA} | 0,85 | 0,84 | 0,87 | 0,88 | 0,95 |

Como se puede observar, la altura relativa de los compuestos semivolátiles como el BaP, prácticamente no se ve afectada por la temperatura del inyector. Sin embargo, en el caso de los compuestos menos volátiles, como el IP, se observa un aumento de un 11% al elevar la temperatura del inyector de 280°C a 310°C. A partir de esta temperatura, la altura relativa entre el compuesto poco volátil respecto al compuesto más volátil se estabiliza en un 35%. En lo que hace referencia a la resolución, aumentar la temperatura del inyector disminuye ligeramente la cola de los picos correspondientes a los compuestos más pesados, reflejándose en un pequeño aumento de la resolución. Por esta razón, se decide trabajar a temperaturas de inyector altas de 325°C.

El tipo de *liner* que se utiliza en el análisis por HRGC también es uno de los parámetros a considerar en la inyección, ya que en su interior es donde se produce la vaporización de la muestra y por donde deben acceder los compuestos de interés a la columna para su separación. Su volumen, la forma de los extremos del *liner* y su morfología en general, determinan el comportamiento del gas antes de ser introducido en la columna. Los liners ensayados en este estudio se presentan en la [Tabla 44], donde se incluyen sus características físicas.

En la [Figura 27], se presentan los resultados obtenidos al inyectar en modo split (5:1) 1 µL de un patrón de los 16 EPA-HAPs con B_{JF} de 500 ng/mL.

Tabla 44. Tipos de liners ensayados. Características físicas.

| Parámetros | Liners | | | |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| | <i>Liner recto</i> | <i>Focus liner</i> | <i>Double Tap simple</i> | <i>Dual Tap Direct Connect (especial)</i> |
| Esquema |  |  |  |  |
| Medidas [OD x ID x L] mm | 6,3 x 4 x 78,5 | 6,3 x 4 x 78,5 | 6,3 x 4 x 78,5 | 6,3 x 4 x 78,5 |
| Volumen (µL) | 990 | 935 | 800 | 585 |
| Tipo de inyección | Split | Split | Splitless | Splitless |

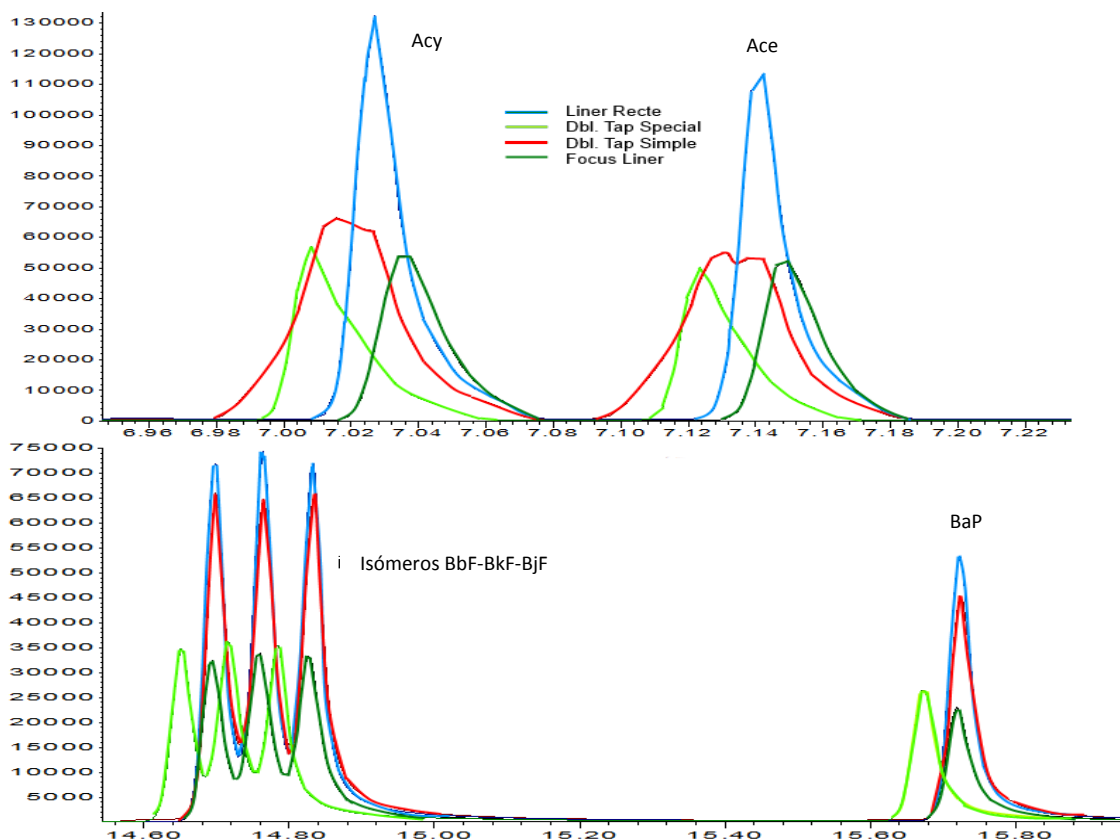


Figura 27. Estudio de los tipos de liner. Resultados patrón 16 EPA-HAPs con B_jF de 500 ng/mL, inyección en split (5:1). Ampliación de la zona inicial (elución Acy y Ace) y media (isómeros benzofluoranteno y BaP) del cromatograma.

Según los resultados obtenidos, el *liner* recto es el que permite obtener más señal tanto de los picos iniciales como de los picos finales, consiguiendo una mejora de sensibilidad. El resto de los liners ensayados ofrecen una intensidad de señal similar con una disminución aproximada del 50% de altura de señal respecto al *liner* recto. El liner tipo *doble tap simple*, presenta problemas de desdoblamiento de los picos iniciales, por lo tanto, se descarta. El *doble tap especial* provoca un ligero avance de los tiempos de retención de los picos respecto al resto de *liners*, esto es debido a la colocación de la columna y al menor volumen del liner.

De manera que el *liner* recto y el *focus liner* serían los más adecuados para continuar la optimización. Por esta razón, se decide estudiar la repetibilidad de inyección con estos dos tipos de *liner* para determinar cuál de los dos ofrece mejores resultados. Para ello, se inyecta por sextuplicado 1 μ L de un patrón de 250 ng/mL de los 16 EPA-HAPs preparado en acetona con una relación de splitter 5:1.

Los coeficientes de variación obtenidos para las alturas del pico de BaP son del 19% con el *liner* recto y del 1,4% con el *focus liner*. Por lo tanto, se corrobora que si se trabaja en modo split, aunque el *liner* recto ofrece una mejor sensibilidad, el *focus liner* permite obtener mejores resultados de repetibilidad de inyección.

Finalmente, se decide optimizar la relación de split, utilizando un *focus liner*. Se estudian inyecciones con relación split 20:1, 10:1, 5:1 y en modo splitless. En la [Figura 28] se presenta la repetibilidad de inyección respecto a la sensibilidad de cada una de las relaciones de split consideradas. En el caso de la sensibilidad, se calcula la relación señal/ruido para el BaP en un patrón de 50 ng/mL. Para el estudio de repetibilidad, se calcula el coeficiente de variación expresado en porcentaje de las tres inyecciones realizadas y se resta de 100.

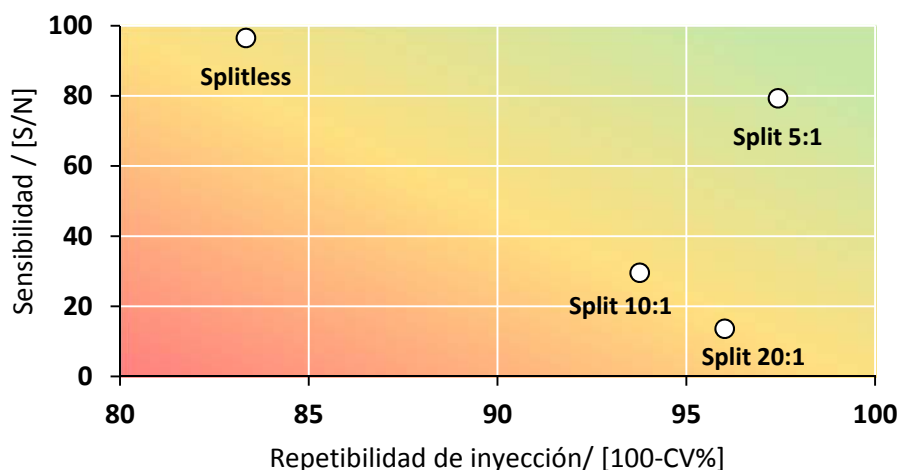


Figura 28. Estudio de la relación de split. Representación de la sensibilidad vs a la repetibilidad de inyección.

Aumentar la relación de split, se refleja en una clara pérdida de sensibilidad, ya que un menor porcentaje de muestra entra en la columna. Sin embargo, al trabajar en splitless aunque se consigue aumentar mucho la relación señal/ruido empeora la repetibilidad de inyección. Por esta razón, se prefiere trabajar en modo split pero con una relación baja (5:1). Aunque al bajar la relación de split, la transferencia a la columna es más lenta y los picos son ligeramente más anchos, se consigue un buen compromiso entre la repetibilidad de inyección y la sensibilidad obtenida.

3.3. MÉTODO CROMATOGRÁFICO GLOBAL PARA LA SEPARACIÓN DE LOS 24 HAPs A ESTUDIO POR HRGC-MS (EI/SIM).

En la [Tabla 45], se presentan las condiciones cromatográficas del métodos definitivo para la separación de los 24 HAPs a estudio por HRGC-MS (EI/SIM).

Tabla 45. Condiciones cromatográficas definitivas para la separación de los 24 HAPs a estudio por HRGC-MS.

| Método cromatográfico inicial. Separación 24 HAPs por HRGC-MS | |
|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Columna | VF17-MS (20m X 0,15 mm x 0,05 µm) |
| Gas portador | Helio |
| Inyección | Modo: <i>Split (5:1)</i> Temperatura: 325°C Volumen inyección: 1 µL Liner: <i>Focus liner</i> Septum: <i>Non-stick BTO (*)</i> |
| Programa de temperatura | Temperatura inicial: 60°C (**) durante 3,10 min Programa: 60°C a 195°C (30°C/min) hasta 205°C (10°C/min) hasta 250°C (20°C/min) hasta 310°C (5°C/min) (***) |
| Modo de trabajo | Presión constante 40 psi |
| Línea de transferencia | Temperatura: 325°C |
| Detección | Modo de ionización: Impacto electrónico a 70 eV Temperatura de la fuente de iones: 300°C Temperatura del cuadrupolo (Selector de iones): 150°C Detección en modo SIM |
| Tiempo de cromatograma | 21 min (cuando no se quiere trabajar con los isómeros del dibenzopireno) 30 min (cuando se quieren determinar los isómeros del dibenzopireno) |

(*) Como la temperatura del inyector es de 325°C, se decide utilizar un septum tipo BTO (*Bleed and Temperature Optimized*) que tiene muy bajo sangrado y soporta temperaturas hasta 400°C.

(**) La temperatura inicial del programa de temperaturas es de 60°C si se trabaja con acetona como disolvente y se sube hasta 80°C si se trabaja con tolueno como disolvente.

(***) Si se quieren determinar los isómeros del dibenzopireno es necesario alargar el tiempo en que se mantiene el programa de temperaturas a la temperatura máxima durante 10 min.

En la [Tabla 46], se presentan los tiempos de retención de los 24 HAPs a estudio (16 EPA-HAPs, BeP, ciclopenta(cd)pireno, 5-metilcriseno y los 4 isómeros del DiBP) en el método cromatográfico puesto a punto por HRGC-MS. Además, se incluyen los iones característicos que se utilizan para la cuantificación en modo SIM, el ion de cuantificación (*target*) y el de identificación (*qualifier*), con las ventanas de detección.

Tabla 46. Listado de los 24 HAPs a estudio analizados por HRGC-MS (EI/SIM). Se incluyen sus puntos de ebullición teóricos [Tabla 3], los tiempos de retención y los tiempos de retención relativos al BaP. También se incluye los iones característicos para la detección en modo SIM y la relación entre ambos: Ion de cuantificación (target) y de identificación (qualifier).

| Compuesto | Punto de ebullición (°C) [Tabla 3] | Tiempo de retención (min) | trR (BaP) | Iones m/z (modo SIM) | | | Ventanas de detección |
|----------------------|---------------------------------------|---------------------------|-----------|----------------------|-----------|---------------------------------|-----------------------|
| | | | | Target | Qualifier | Relación abundancia entre iones | |
| Naftaleno | 218 | 5,27 | 0,34 | 128 | 102 | 7,0 | Grupo 1 |
| Acenaftileno | 265 | 6,93 | 0,45 | 152 | 151 | 17,6 | Grupo 2 |
| Acenafteno | 279 | 7,05 | 0,45 | 153 | 152 | 51,4 | |
| Fluoreno | 295 | 7,49 | 0,48 | 166 | 165 | 100,6 | Grupo 3 |
| Fenantreno | 340 | 8,55 | 0,55 | 178 | 176 | 22,6 | |
| Antraceno | 342 | 8,95 | 0,57 | 178 | 176 | 23,3 | Grupo 4 |
| Fluoranteno | 375 | 10,06 | 0,65 | 202 | 200 | 20,5 | |
| Pireno | 393 | 10,42 | 0,67 | 202 | 200 | 18,1 | Grupo 5 |
| Benzo(a)antraceno | 400 | 11,83 | 0,76 | 228 | 226 | 25,9 | |
| Ciclopenta(cd)pireno | 438 | 12,14 | 0,78 | 226 | 224 | 22,4 | Grupo 6 |
| Criseno | 448 | 12,33 | 0,79 | 228 | 226 | 31,6 | |
| 5-metilcriseno | 449 | 12,98 | 0,83 | 242 | 241 | 56,1 | Grupo 7 |
| Benzo(b)fluoranteno | 480 | 14,55 | 0,93 | 252 | 250 | 22,3 | |
| Benzo(k)fluoranteno | 480 | 14,62 | 0,94 | 252 | 250 | 23,5 | Grupo 8 |
| Benzo(j)fluoranteno | 480 | 14,79 | 0,95 | 252 | 250 | 28,0 | |
| Benzo(e)pireno | 493 | 15,45 | 0,99 | 252 | 250 | 32,0 | Grupo 7 |
| Benzo(a)pireno | 496 | 15,57 | 1,00 | 252 | 250 | 25,0 | |
| Benzo(ghi)perileno | 545 | 18,61 | 1,20 | 276 | 274 | 22,6 | Grupo 8 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 524 | 18,70 | 1,20 | 278 | 276 | 52,0 | |
| Indeno(123-cd)pireno | 536 | 19,55 | 1,26 | 276 | 274 | 22,5 | Grupo 8 |
| Dibenzo(al)pireno | 552 | 23,18 | 1,49 | 302 | 300 | 49,6 | |
| Dibenzo(ae)pireno | ND | 24,20 | 1,55 | 302 | 300 | 24,6 | Grupo 8 |
| Dibenzo(ai)pireno | ND | 24,76 | 1,59 | 302 | 300 | 19,0 | |
| Dibenzo(h)pireno | ND | 25,11 | 1,61 | 302 | 300 | 19,5 | Grupo 8 |

trR (BaP): tiempo de retención del compuesto "i" respecto al BaP; ND: no disponible

Tabla 47. Ventanas de detección (Grupos de detección), iones (m/z) y el tiempo de permanencia en cada uno de los iones (dwell time).

| Ventana de detección | Iones (m/z) | Dwell time |
|----------------------|-----------------|------------|
| Grupo 1 | 102 - 128 | 80 |
| Grupo 2 | 151 - 152 - 153 | 30 |
| | 165 - 166 | |
| Grupo 3 | 176 - 178 | 80 |
| Grupo 4 | 200 - 202 | 80 |
| Grupo 5 | 224 - 226 - 228 | 30 |
| | 241 - 242 | |
| Grupo 6 | 250 - 252 | 80 |
| Grupo 7 | 274 - 276 - 278 | 50 |
| Grupo 8 | 300 - 302 | 80 |

Como se puede observar, los compuestos se eluyen fundamentalmente según su punto de ebullición. Realmente, sólo se observa alteración en el orden de elución en el caso del grupo DiBahA, BghiP e IP. En este caso, los valores hallados bibliográficamente son muy parecidos y podría ser que su error asociado fuese el responsable de esta alteración.

3.4. ESTUDIO DEL PATRÓN INTERNO

A pesar de los cambios realizados en el método cromatográfico para reducir la pérdida de señal de los compuestos menos volátiles, se sigue obteniendo una menor señal en los compuestos más pesados respecto a los menos pesados. Este problema es inherente tanto al sistema instrumental disponible como a la columna de trabajo, ya que no es posible subir más las temperaturas, especialmente de la fuente de iones y de la línea de transferencia.

Se ha comprobado que a la señal de los compuestos a estudio va disminuyendo a lo largo de la serie de trabajo y que esta disminución es más acusada a medida que aumenta la masa molecular del compuesto. Esta falta de estabilidad de la respuesta es esperable ya que se trabaja con un detector espectrómetro de masas y, en este caso, se ve más acusada ya que se trabaja en condiciones límite de temperatura tanto de columna, como de línea de transferencia como del detector.

Por esta razón, y teniendo en cuenta la variabilidad de la inyección inherente por cromatografía de gases, se plantea la posibilidad de introducir un patrón interno, que compense tanto la falta de repetibilidad de inyección, como de estabilidad de la señal del detector, como la falta de recuperación en la preparación cuando se trabaje con muestras complejas.

Se propone trabajar con patrones internos deuterados de los mismos HAPs. Pero en lugar de utilizar un patrón que incluya los 24 HAPs a estudio pero deuterados, para aumentar la versatilidad del patrón y disminuir el precio del mismo, se propone utilizar un patrón que contenga únicamente 3 de los HAPs a estudio totalmente deuterados.

El patrón interno propuesto incluye acenaftileno D8, pireno D10 y benzo(a)pireno D12 [PAH MIX 77 de 10 mg/L preparado en tolueno, distribuido por Dr. *Ehrenstorfer*].

En la [Tabla 48], se presentan los tres patrones internos propuestos, sus masas moleculares y su ion característico para la detección en modo SIM. También se incluyen su número de anillos aromáticos, así como los compuestos sobre los que actuará como patrón interno. En este caso, sólo es necesario escoger uno de los iones característicos (el ion *target*). Aumentar el número de iones sólo haría perder sensibilidad. No tiene sentido corroborar la presencia de dicho compuesto, ya que se ha adicionado expresamente, se conoce su tiempo de retención y su presencia en la muestra no es posible ya que está deuterado.

Cabe destacar, que el ion seleccionado para su detección en modo SIM, se escoge después del estudio de sus espectros de masas, donde se corrobora que el ion molecular corresponde con el pico base del espectro.

Tabla 48. Patrones internos deuterados. Compuestos, masas moleculares, iones característicos, compuestos sobre los que actúan como patrón interno (PI).

| Propiedades | Patrones internos (PI) | | |
|--------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| | Acenaftileno D8 | Pireno D10 | BaP D12 |
| Masa molecular | 160 | 212 | 264 |
| Ion característico | 160 | 212 | 264 |
| Número de anillos (estructura del PI) | 3 | 4 | 5 |
| Número de anillos de los compuestos para el que es PI | 2-3 | 4 | ≥ 5 |
| Compuestos para los que es PI | Na, Ace, Acy, Fl, Fe, An | F, Pyr, Cp(cd)P, BaA 5MeCry, Cry | BbF, BkF, BjF, BeP, BaP, DiBahA, BghiP, IP isómeros DiBP |

Para conocer su tiempo de retención, se inyecta en las condiciones cromatográficas definitivas para la separación de los 24 HAPs [Tabla 45], un patrón de 1000 ng/mL de los tres compuestos deuterados, disuelto en acetona. Éste se prepara por dilución a partir del patrón conjunto comercial PAH MIX 77 de 10 mg/L.

En las condiciones cromatográficas propuestas se observa que, los tres compuestos deuterados a estudio, se eluyen justo antes de su compuesto no deuterado, solapándose parcialmente, a pesar de ser éstos más pesados que el compuesto sin deutarar¹⁰. En este caso, la falta de resolución entre el compuesto deuterado y el no deuterado no es un problema, ya que la diferencia entre sus masas moleculares es suficientemente significativa. Existe un incremento de 8 unidades de masa entre el acenaftileno D8 y el acenaftileno, de 10 unidades de masa entre el Pyr-D10 y el Pyr, y de 12 unidades de masa entre el BaP-D12 y el BaP.

En la [Tabla 49], se presentan los tiempos de retención de los compuestos deuterados, considerados patrones internos, y los de los mismos compuestos sin deutarar. También se incluye, sus tiempos de retención relativos tanto respecto al compuesto no deuterado como respecto al BaP y la ventana de detección donde se deberá incluir su ion característico para poder ser determinado con el método cromatográfico definitivo de separación de los 24 HAPs optimizado [Tabla 47]

Tabla 49. Patrones internos deuterados. Tiempos de retención, tiempos de retención relativos al compuesto no deuterado (trR(i)) y al BaP (trR(BaP)) y ventanas de detección [Tabla 46].

| Compuesto | Tiempo retención (min) | trR (i) | trR (BaP) | Ventanas de detección |
|---------------------------|------------------------|---------------|--------------|--------------------------|
| Acenaftileno D8 | 6,91 | 0,9970 | 0,444 | Grupo 2 [m/z=160] |
| <i>Acenaftileno</i> | <i>6,93</i> | <i>1</i> | <i>0,445</i> | |
| Pireno D10 | 10,39 | 0,9975 | 0,667 | Grupo 4 [m/z=212] |
| <i>Pireno</i> | <i>10,42</i> | <i>1</i> | <i>0,669</i> | |
| Benzo(a)pireno D12 | 15,49 | 0,9951 | 0,995 | Grupo 6 [m/z=264] |
| <i>Benzo(a)pireno</i> | <i>15,57</i> | <i>1</i> | <i>1</i> | |

¹⁰ Se ha comprobado que tanto para el benceno como para el tolueno, los compuestos deuterados tienen un punto de ebullición ligeramente menor que el compuesto sin deutarar, justificando el orden de elución obtenidos (no se han encontrado datos bibliográficos para los HAPs).

3.5. ESTUDIO DE PARÁMETROS DE DETECCIÓN CON EL ESPECTRÓMETRO DE MASAS: LINEALIDAD Y LOD/LOQ. MÉTODO CROMATOGRÁFICO GLOBAL PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS 24 HAPs A ESTUDIO POR HRGC-MS (EI/SIM).

Con la finalidad de valorar el método cromatográfico de los 24 HAPs por HRGC-MS (EI/SIM) y poder compararlo con el mismo método pero por HPLC-FLU, se decide estudiar los parámetros de linealidad y los límites de detección y de cuantificación. Estos parámetros, igual que se ha realizado con el método de HPLC-FLU, se han valorado con patrones. De esta manera, se fijarán los rangos de trabajo con los que es posible trabajar y las concentraciones límite.

En este caso, se inyectan en las condiciones cromatográficas para la determinación de los 24 HAPs a estudio por HRGC-MS (EI/SIM) [Tabla 45], cinco disoluciones conjuntas de HAPs preparadas en acetona de concentraciones comprendidas entre 10 ng/mL y 1000 ng/mL, para cada uno de los compuestos (10 ng/mL, 80 ng/mL, 200 ng/mL, 400 ng/mL y 1000 ng/mL). Por una parte, se prepara una serie de diluciones a partir del patrón conjunto comercial concentrado PAH MIX 9 (100 mg/L), que incluyen los 16 EPA-HAPs. Y, por otra parte, se realizan las mismas diluciones pero a partir del patrón conjunto comercial PAH MIX 170. Esta disolución incluye los 15 HAPs prioritarios para la SCF incluidos en la Recomendación 2005/108/EC.

Para el estudio de los parámetros de calidad de los 16 EPA-HAPs se realiza con la primera de las series de diluciones, mientras que la linealidad y las concentraciones límite de los compuestos: B_jF, 5-MeCry, CP(cd)P y los cuatro isómeros del dibenzopireno, se estudia con la segunda serie de diluciones.

Tal y como se ha comentado en el apartado anterior [3.4. ESTUDIO DEL PATRÓN INTERNO], se plantea la posibilidad de trabajar con patrones internos deuterados. Así, la valoración de la linealidad se realizará tanto con patrón interno como sin patrón interno.

Se prepara una disolución concentrada de patrón interno (acenaftileno D8, pireno D10 y BaP D12) de 1000 ng/mL a partir de la disolución comercial conjunta PAH MIX 77 (10 ng/L). Se preparan unos pocos mililitros ya que se está limitado al volumen de disolución concentrada disponible.

Así, los patrones conjuntos con patrón interno se preparan tomando 150 µL de la disolución diluida de patrón de HAPs (10, 80, 200, 400 y 1000 ng/mL de cada compuesto) y 25 µL de una disolución de patrón interno de 1000 ng/mL. La mezcla se realiza directamente en el vial de inyector automático y se mezcla vigorosamente con el Vórtex. De manera que la concentración de HAPs en cada una de las disoluciones disminuye aproximadamente un 14%. Mientras que la concentración de patrón interno en todos los casos es de unos 140 ng/mL.

3.5.1. Estudio de linealidad.

La linealidad se estudia en un rango de concentración de 10 ng/mL a 1000 ng/mL.

Con la finalidad de considerar la posibilidad de trabajar con patrón interno, se valora la linealidad para 5 de los analitos a estudio con patrón interno y sin él. Se incluye un compuesto de alta volatilidad (acenaftileno), otro de volatilidad media (pireno) y tres compuestos de baja volatilidad (benzo(a)pireno, indeno(123-cd)pireno y dibenzo(a)pireno).

En todos los casos, se considerará tanto el ajuste por mínimos cuadrados como el coeficiente de variación de los factores de respuesta.

Con el ajuste por mínimos cuadrados se valorarán las rectas de regresión desde el punto de vista de su coeficiente de determinación (R^2) y de los valores residuales (considerando el valor residual del patrón más diluido como máximo y que altera la homocedasticidad). Además, también se valorarán los parámetros de la recta, pendiente y ordenada en el origen, a partir del estudio de sus intervalos de confianza calculados a partir de la *t-Student* (probabilidad del 95%).

Con el coeficiente de variación de los factores de respuesta se valora la proporcionalidad de la respuesta.

En la [Tabla 50] y en la [Tabla 51], se presentan los resultados del estudio de linealidad (recta de regresión y factores de respuesta, respectivamente), tanto con patrón interno como sin él, de los cinco HAPs representativos en un rango de concentraciones de 10 a 1000 ng/mL.

Tabla 50. HRGC-MS (EI/SIM) sin patrón interno y con patrón interno. Resultados del ajuste por mínimos cuadrados para 5 HAPs en un rango de 10 a 1000 ng/mL. Se incluyen tanto los coeficientes de determinación (R^2) como el valor residual del patrón diluido como los intervalos de confianza (IC) de los parámetros de la recta, pendiente y ordenada en el origen.

| Compuesto | Recta regresión | | Crítica modelo R^2 | Residual (%) Patrón diluido | Valoración parámetros recta | | | |
|---------------------------|------------------------|-----------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------|---------------|---|
| | Pendiente (área/ng/mL) | Ordenada (área) | | | IC pendiente | IC ordenada origen | | |
| SIN PATRÓN INTERNO | | | | | | | | |
| Acenaftileno | 248 | -1043 | 0,9999 | 43 | [243, 252] | √ | [-2936, 850] | √ |
| Pireno | 302 | -2421 | 0,9997 | 88 | [292, 312] | √ | [-6861, 2020] | √ |
| Benzo(a)pireno | 260 | -2416 | 0,9995 | 104 | [250, 270] | √ | [-6836, 2004] | √ |
| Indeno(123-cd)pireno | 218 | -2723 | 0,9989 | 145 | [205, 231] | √ | [-8401, 2956] | √ |
| Dibenzo(a)pireno | 136 | -1580 | 0,9989 | 133 | [128, 144] | √ | [-3511, 351] | √ |
| CON PATRÓN INTERNO | | | | | | | | |
| Acenaftileno | 1,073 | -0,034 | 0,9999 | 47 | [1,05, 4,0 10 ⁻⁰⁷] | √ | [-0,09, 0,16] | √ |
| Pireno | 1,216 | -0,065 | 0,9997 | 84 | [1,18, 1,26] | √ | [-0,19, 0,05] | √ |
| Benzo(a)pireno | 1,439 | -0,091 | 0,9997 | 100 | [1,39, 1,49] | √ | [-0,23, 0,05] | √ |
| Indeno(123-cd)pireno | 1,110 | -0,078 | 0,9989 | 112 | [1,04, 1,18] | √ | [-0,29, 0,13] | √ |
| Dibenzo(a)pireno | 0,976 | -0,028 | 0,9996 | 41 | [0,94, 1,01] | √ | [-0,09, 0,03] | √ |

Tabla 51. HRGC-MS (EI/SIM) sin patrón interno y con patrón interno. Resultados de los factores de respuesta para los 5 HAPs en un rango de 10 a 1000 ng/mL: promedio y coeficientes de variación.

| Compuesto | SIN PATRÓN INTERNO FR (ng/mL/área) | | CON PATRÓN INTERNO FR (ng/mL/área) | |
|----------------------|---------------------------------------|------|---------------------------------------|-----|
| | Promedio | CV% | Promedio | CV% |
| Acenaftileno | 4,19E-03 | 2,5 | 0,971 | 2,9 |
| Pireno | 3,52E-03 | 3,6 | 0,875 | 3,7 |
| Benzo(a)pireno | 4,20E-03 | 6,7 | 0,761 | 7,1 |
| Indeno(123-cd)pireno | 5,03E-03 | 5,3 | 0,956 | 3,4 |
| Dibenzo(al)pireno | 9,18E-03 | 17,4 | 1,071 | 3,2 |

Como se puede observar, en los resultados del estudio de linealidad realizado en el rango de 10 a 1000 ng/mL para los 5 compuestos escogidos:

- Tanto si se trabaja con patrón interno como sin patrón interno, para todos los compuestos, existe una relación lineal entre la concentración y el área obtenida, ya que los coeficientes de determinación (R^2) son superiores a 0,99.

Además, los parámetros de la recta son siempre estadísticamente significativos, ya que, los intervalos de confianza de las pendientes nunca incluyen el cero y los de la ordenada en el origen lo incluyen en todos los casos.

Sin embargo, los valores residuales que corresponden al patrón más diluido son altos, y son mayores al aumentar la masa molecular del compuesto. Esto es esperable ya que el rango de trabajo es amplio (incluye dos órdenes de magnitud) y en el ajuste por mínimos cuadrados pesan más las concentraciones más altas. Una posibilidad que existe para disminuir esta influencia cuando el rango de concentraciones es amplio, no existe homogeneidad de varianzas y los resultados analíticos se suelen encontrar en el rango inferior de la recta de calibrado es aprovechar la ponderación ($1/x$) que permite realizar el software del equipo. En este caso, aplicando este nuevo ajuste $1/x$ vs y , los valores residuales disminuyen hasta el 10%.

- En lo que hace referencia a los coeficientes de variación de los factores de respuesta, en todos los casos son inferiores al 15%, excepto para el dibenzo(al)pireno cuando se trabaja sin patrón interno. Aunque si se comparan los resultados, cuando se trabaja con patrón interno los coeficientes de variación son siempre inferiores o iguales a los obtenidos sin patrón interno.

Así, teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los patrones estudiados, la respuesta es lineal en el rango de concentraciones de 10 a 1000 ng/mL, y se prefiere trabajar con patrón interno.

En la [Tabla 52] y [Tabla 53], se presentan los resultados de linealidad con patrón interno de los 19 HAPs restantes. Se incluyen, respectivamente, los resultados del ajuste por mínimos cuadrados y el estudio de los factores de respuesta.

Tabla 52. HRGC-MS (EI/SIM) con patrón interno. Resultados del ajuste por mínimos cuadrados para los HAPs en un rango de 10 a 1000 ng/mL. Se incluyen tanto los coeficientes de determinación (R^2) como los intervalos de confianza (IC) de los parámetros de la recta, pendiente y ordenada en el origen.

| Compuesto | Recta regresión | | Crítica modelo | Residual (%) | Valoración parámetros recta | | | |
|----------------------|------------------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------------------|---|--------------------|---|
| | Pendiente (área/ng/mL) | Ordenada (área) | R^2 | Patrón diluido | IC pendiente | ✓ | IC ordenada origen | ✓ |
| Naftaleno | 1,216 | -0,009 | 1,0000 | 23 | [1,205, 1,227] | ✓ | [-0,043, 0,025] | ✓ |
| Acenafteno | 0,697 | -0,029 | 0,9998 | 63 | [0,679, 0,714] | ✓ | [-0,082, 0,024] | ✓ |
| Fluoreno | 0,759 | -0,037 | 0,9998 | 75 | [0,737, 0,781] | ✓ | [-0,102, 0,029] | ✓ |
| Fenantreno | 1,120 | -0,056 | 0,9998 | 77 | [1,088, 1,152] | ✓ | [-0,152, 0,041] | ✓ |
| Antraceno | 1,114 | -0,076 | 0,9995 | 109 | [1,070, 1,158] | ✓ | [-0,207, 0,056] | ✓ |
| Fluoranteno | 1,251 | -0,074 | 0,9996 | 94 | [1,205, 1,296] | ✓ | [-0,212, 0,063] | ✓ |
| Benzo(a)antraceno | 1,046 | -0,070 | 0,9995 | 108 | [1,003, 1,089] | ✓ | [-0,201, 0,060] | ✓ |
| Ciclopenta(cd)pireno | 1,116 | -0,082 | 0,9993 | 120 | [1,064, 1,169] | ✓ | [-0,241, 0,076] | ✓ |
| Criseno | 0,899 | -0,007 | 0,9999 | 11 | [0,885, 0,914] | ✓ | [-0,031, 0,016] | ✓ |
| 5-metilcriseno | 0,555 | -0,006 | 0,9999 | 17 | [0,547, 0,564] | ✓ | [-0,020, 0,007] | ✓ |
| Benzo(b)fluoranteno | 1,477 | -0,076 | 0,9998 | 79 | [1,440, 1,514] | ✓ | [-0,186, 0,035] | ✓ |
| Benzo(k)fluoranteno | 1,623 | -0,146 | 0,9993 | 155 | [1,543, 1,703] | ✓ | [-0,386, 0,094] | ✓ |
| Benzo(j)fluoranteno | 1,095 | -0,039 | 0,9995 | 48 | [1,052, 1,138] | ✓ | [-0,107, 0,030] | ✓ |
| Benzo(e)pireno | 1,480 | -0,083 | 0,9999 | 98 | [1,399, 1,510] | ✓ | [-0,155, 0,043] | ✓ |
| Benzo(ghi)perileno | 1,110 | -0,078 | 0,9989 | 112 | [1,041, 1,179] | ✓ | [-0,286, 0,130] | ✓ |
| Dibenzo(ah)antraceno | 1,279 | -0,132 | 0,9993 | 193 | [1,218, 1,339] | ✓ | [-0,314, 0,050] | ✓ |
| Dibenzo(ae)pireno | 0,897 | -0,012 | 0,9999 | 24 | [0,878, 0,916] | ✓ | [-0,043, 0,018] | ✓ |
| Dibenzo(ai)pireno | 1,095 | 0,016 | 0,9992 | 41 | [1,052, 1,138] | ✓ | [-0,107, 0,030] | ✓ |
| Dibenzo(ah)pireno | 0,871 | -0,027 | 0,9996 | 48 | [0,838, 0,904] | ✓ | [-0,080, 0,027] | ✓ |

Tabla 53. HRGC-MS (EI/SIM) con patrón interno. Resultados de los factores de respuesta para los HAPs en un rango de 10 a 1000 ng/mL: promedio y coeficientes de variación.

| Compuesto | FR (ng/mL/área) | |
|----------------------|-----------------|------|
| | Promedio | CV% |
| Naftaleno | 0,809 | 6,1 |
| Acenafteno | 1,504 | 2,8 |
| Fluoreno | 1,392 | 3,2 |
| Fenantreno | 0,948 | 3,7 |
| Antraceno | 0,974 | 5,0 |
| Fluoranteno | 0,858 | 4,2 |
| Benzo(a)antraceno | 1,039 | 5,4 |
| Ciclopenta(cd)pireno | 0,976 | 5,2 |
| Criseno | 1,127 | 1,3 |
| 5-metilcriseno | 1,832 | 2,0 |
| Benzo(b)fluoranteno | 0,725 | 4,9 |
| Benzo(k)fluoranteno | 0,699 | 9,0 |
| Benzo(j)fluoranteno | 0,976 | 4,1 |
| Benzo(e)pireno | 0,806 | 7,5 |
| Benzo(ghi)perileno | 0,956 | 3,4 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 0,931 | 14,7 |

| Compuesto | FR (ng/mL/área) | |
|-------------------|-----------------|-----|
| | Promedio | CV% |
| Dibenzo(ae)pireno | 1,130 | 4,0 |
| Dibenzo(ai)pireno | 0,893 | 3,9 |
| Dibenzo(ah)pireno | 1,191 | 6,3 |

Los resultados del estudio de linealidad obtenidos para los 5 HAPs (Acy, Pyr, BaP, IP y DiBaP) se corroboran también para los 19 HAPs de estudio restantes asegurándose una linealidad de la respuesta en el rango de concentraciones de 10 a 1000 ng/mL, trabajando con patrón interno, ya que:

- Los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos en el ajuste por mínimos cuadrados son en todos los casos superiores a 0,99.
- Los parámetros de todas las rectas obtenidas son estadísticamente significativos. Los valores de las pendientes son estadísticamente diferentes a cero, mientras que las ordenadas en el origen incluyen el cero.
- Todos los coeficientes de variación de los factores de respuesta son inferiores al 15%.

3.5.2. Estudio de las concentraciones límite (LOD/LOQ).

El cálculo de las concentraciones límite (LOD/LOQ), se realiza igual que en el caso del método cromatográfico puesto a punto por HPLC-FLU, de forma teórica a partir del estudio de la relación señal/ruido del patrón de concentración más baja de la recta de calibrado, siguiendo la [Ecuación 2].

En la [Tabla 54], se presentan las concentraciones límite (LOD/LOQ) para cada uno de los HAPs a estudios correspondientes al método cromatográfico puesto a punto por HRGC-MS (EI/SIM).

Tabla 54. Concentraciones límite (LOD/LOQ) para los HAPs a estudio en el método cromatográfico puesto a punto por HRGC-MS (EI/SIM). Naranja: LOQ>5 ng/mL; Gris: 5< LOQ<1 ng/mL; Negro: LOQ< 1 ng/mL.

| Compuesto | Concentración patrón referencia (ng/mL) | Señal/Ruido | LOD (ng/mL) | LOQ (ng/mL) |
|----------------------|-----------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Naftaleno | 9,0 | 98 | 0,3 | 0,9 |
| Acenaftileno | 9,0 | 104 | 0,3 | 0,9 |
| Acenafteno | 9,0 | 114 | 0,2 | 0,8 |
| Fluoreno | 9,0 | 91 | 0,3 | 1,0 |
| Fenantreno | 9,0 | 81 | 0,3 | 1,1 |
| Antraceno | 9,0 | 89 | 0,3 | 1,0 |
| Fluoranteno | 9,0 | 65 | 0,4 | 1,4 |
| Pireno | 9,0 | 60 | 0,5 | 1,5 |
| Benzo(a)antraceno | 9,0 | 49 | 0,6 | 1,8 |
| Ciclopenta(cd)pireno | 9,6 | 58 | 0,5 | 1,7 |
| Criseno | 9,0 | 55 | 0,5 | 1,6 |
| 5-metilcriseno | 9,6 | 27 | 1,1 | 3,6 |
| Benzo(b)fluoranteno | 9,0 | 30 | 0,9 | 3,0 |
| Benzo(k)fluoranteno | 9,0 | 30 | 0,9 | 3,0 |
| Benzo(j)fluoranteno | 9,6 | 33 | 0,9 | 2,9 |
| Benzo(a)pireno | 9,0 | 31 | 0,9 | 2,9 |
| Benzo(e)pireno | 9,6 | 35 | 0,8 | 2,7 |
| Benzo(ghi)perileno | 9,0 | 17 | 1,6 | 5,5 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 9,0 | 17 | 1,6 | 5,5 |
| Indeno(123-cd)pireno | 9,0 | 17 | 1,6 | 5,5 |
| Dibenzo(al)pireno | 9,6 | 13 | 2,2 | 7,4 |
| Dibenzo(ae)pireno | 9,6 | 14 | 2,1 | 6,9 |
| Dibenzo(ai)pireno | 9,6 | 8 | 3,6 | 12,0 |
| Dibenzo(ah)pireno | 9,6 | 6 | 4,8 | 16,0 |

Como se puede observar en la [Tabla 54], la concentración límite expresada como LOQ para la mayoría de los HAPs a estudio cuando se trabaja con un sistema de HRGC-MS (EI/SIM) se encuentran entre 1 y 5 ng/mL, igual que sucedía por HPLC-FLU. Los HAPs que tienen LOQ teóricos superiores a 5 ng/mL son naftaleno, acenaftileno y acenafteno que son los compuestos más volátiles. Sin embargo, los compuestos más pesados, a pesar de trabajar con temperaturas altas de la fuente de iones, son los que se ven más afectados por la pérdida de sensibilidad y se obtienen LOQ superiores a 5 ng/mL, llegando a 16 ng/mL en el compuesto menos volátil. A pesar de ello, en estos casos se podría decir que su concentración límite sería aproximadamente 10 ng/mL. Estos resultados son coherentes con los límites inferiores del rango de linealidad estudiado.

3.6. COMPARATIVA DE MÉTODOS: HRGC-MS (EI/SIM) vs. HPLC-FLU.

Si se comparan los dos métodos cromatográficos puestos a punto para la separación de los 24 HAPs (16 EPA-HAPs con benzo(j)fluoranteno, 5-metilcriseno, ciclopenta(cd)pireno benzo(e)pireno y los cuatro isómeros del dibenzopireno) tanto por HRGC-MS (EI/SIM) como por HPLC-FLU, se puede decir que:

- **Separación:** Por cromatografía de gases es posible no sólo separar los 24 HAPs a estudio sino también cuantificarlos. Hay que tener en cuenta que por HPLC-FLU tanto el acenaftileno como el ciclopenta(cd)pireno no son fluorescentes, por lo que no se pueden cuantificar con este detector. Además, el BeP por HPLC se solapa parcialmente con el BbF, mientras que por HRGC esto no sucede. Así, que la cuantificación por fluorescencia se debe tener en cuenta la influencia de las parejas de longitudes de onda de un compuesto respecto al otro.
- **Orden de elución:** El orden de elución de los HAPs en la columna VF17 se puede describir fundamentalmente según su punto de ebullición, donde los compuestos se eluyen en orden creciente. Si se compara el orden de elución obtenido con la columna Pursuit HAP 3 (HPLC) y con la columna VF17 (HRGC) se puede decir que coincide en prácticamente en todos los compuestos. Como excepciones se pueden destacar que por HRGC:

El ciclopenta(cd)pireno se eluye entre BaA y Cry, es decir, se retrasa ligeramente según lo obtenido por HPLC.

El orden de los isómeros del benzofluoranteno cambia respecto a lo obtenido en HPLC. En HRGC el orden es BbF, BkF y BjF, mientras que por HPLC invierten su orden de elución (BjF, BbF y BkF).

El orden de elución de DiBahA y BghiP también se invierte respecto a lo obtenido por HPLC (HRGC: BghiP-DiBahA; HPLC: DiBahA-BghiP).

Los isómeros del dibenzopireno se eluyen todos después del IP. Pero el orden de elución entre ellos coincide en las dos técnicas.

Como se puede observar, los compuestos que alteran su orden de elución coinciden con los que habían avanzado su orden por HPLC, debido a su distribución espacial.

- **Sensibilidad:** Aunque se ha conseguido mejorar mucho el problema de la bajada de sensibilidad para los compuestos más pesados por cromatografía de gases, son estos compuestos los que tienen menos señal. Sin embargo, por HPLC el BkF y el BaP, dos de los compuestos más pesados, son los que presentan una mayor señal.
- **Tiempo de cromatograma:** el último de los 16 EPA-HAPs (IP) se eluye con un tiempo de retención de 11 min por HPLC mientras que por HRGC se eluye en unos 20 min, es decir,

a pesar de trabajar con columnas ultrarrápidas el tiempo de cromatograma por cromatografía de gases es el doble del que se obtiene por HPLC.

- **Identificación:** por HRGC-MS es posible la confirmación de los picos detectados por tiempos de retención mediante la determinación de la relación de abundancias entre los iones característicos escogidos para cada compuesto (señal ion cuantificación vs señal ion de identificación). Por HPLC-FLU, aunque a priori la identificación de los picos sólo se realizaría por tiempos de retención y por la señal a la pareja de longitudes de onda escogida para la detección, se propone trabajar con dos parejas de longitudes de onda para cada compuesto. De esta manera, se puede realizar un cálculo equivalente al que se realiza por HRGC-MS con la relación de iones, pero con la relaciones de respuestas a dos parejas de longitudes de onda diferentes, pudiendo llevar a cabo también esta confirmación.
- **Uso de la columna de trabajo:** por HPLC las precauciones con la columna son mínimas. Se debe tener en cuenta su limpieza y conservación además, se plantea la posibilidad de utilizar pre-columna para aumentar la vida de la columna. En el caso de HRGC, la columna de trabajo sufre mucho más. Hay que destacar que como se trabaja con compuestos mayoritariamente poco volátiles, tanto la temperatura de la línea de transferencia, como la temperatura del inyector como la temperatura máxima del programa de temperaturas de elución, son altas. Por lo que la vida de la columna disminuye considerablemente. Además, como el espesor de la fase estacionara es tan fino, enseguida se pierde en la zonas sobrecalentadas, de manera que se resiente notablemente la eficacia/resolución de los picos de los compuestos más pesados (isómeros del benzofluoranteno y el DiBahA-BghiP e IP). Para solucionar este problema, se propone cortar la parte de la columna que se encuentra dentro de la línea de transferencia, regenerando así la columna. Además, para alargar la vida de la columna se propone tomar la precaución de mientras no se está trabajando bajar la temperaturas, tanto de la línea de transferencia como de la fuente de iones.
- **Patrón interno.** Se ha comprobado que por HRGC-MS es preferible trabajar con patrón interno para conseguir compensar la pérdida de señal de los compuestos menos volátiles a lo largo de la serie, consiguiendo mejorar la proporcionalidad de la respuesta. Se propone trabajar con patrones internos deuterados. En cambio, por HPLC el uso del patrón interno no es necesario, simplificando la etapa de preparación de patrones, muestras y el tratamiento posterior de la información.
- **Rango de trabajo (linealidad y LOQ).** Los rangos de trabajo, expresados como concentración de disolución inyectada, son equivalentes en las dos técnicas utilizadas y cubren un margen de concentraciones de 10 ng/mL a 1000 ng/mL. Todas las rectas obtenidas por mínimos cuadrados son adecuadas ($R^2 > 0,99$ y parámetros significativos) y todos los coeficientes de variación de los factores de respuesta son inferiores al 15%. Aunque, cabe destacar que, en el caso de trabajar con el método puesto a punto por HRGC-MS, los coeficientes de variación de los factores de respuesta obtenidos son mayores que los que se obtienen por HPLC-FLU.

4. MÉTODO 3: UHPLC-FLU.

Hasta el momento, se han presentado dos métodos cromatográficos que permiten la separación de 24 HAPs (los 16 EPA-HAPs además de los compuestos de interés en el campo de la alimentación, B_jF, CP(cd)P, 5MeCry, BeP y los 4 isómeros del dibenzopireno), tanto por cromatografía líquida como por cromatografía de gases. Aunque en ambos casos la separación es posible, el indeno(123-cd)pireno, compuesto más pesado de los 16 EPA-HAPs, se eluye a los 11 min con el método cromatográfico puesto a punto por HPLC y a los 20 min con el método de cromatografía de gases.

El tiempo del método cromatográfico optimizado por HRGC es difícil reducirlo con la instrumentación disponible en la Sección de Cromatografía, ya que la separación ya se ha optimizado en una columna ultrarrápida (con diámetro interno reducido). Sin embargo, el método optimizado por cromatografía líquida es mejorable con la aplicación de la técnica de *Ultra High-Performance Liquid Chromatography* o UHPLC.

4.1. INTRODUCCIÓN A LA TÉCNICA DE UHPLC.

La técnica de UHPLC aparece en el año 2004 como evolución de la cromatografía líquida convencional. Tiene su origen en la necesidad de la industria de aumentar la productividad sin comprometer la calidad de los resultados.

En la cromatografía de gases, gracias a la longitud y al estrecho diámetro de sus columnas y a su escaso espesor de fase, era posible obtener elevadísimas eficacias. Sin embargo, la cromatografía líquida estaba estancada en este sentido.

Durante cuatro décadas, la reducción del tamaño de partícula de las fases estacionarias de las columnas de cromatografía líquida, se había utilizado para mejorar la eficacia cromatográfica, haciendo un camino equivalente a la cromatografía de gases. Durante los inicios de los años 70, las fases estacionarias estaban formadas básicamente por un recubrimiento pelicular no poroso de 40 µm que evoluciona hasta finales de los 70 hacia partículas irregulares micro-porosas de 10 µm de diámetro. Con este cambio, se consiguió aumentar 25 veces la eficacia de las columnas. Desde los años 80 hasta los inicios del año 2000, este aspecto fue evolucionando. Se ha trabajado con columnas de cromatografía líquida rellenas con partículas esféricas micro-porosas de entre 5 µm y 3,5 µm. Estas columnas pueden soportar hasta 300 bar con eficacias de hasta 80000 platos/metro, 80 veces superior a las columnas iniciales de 40 µm. Pero llega un momento, en que esta evolución lógica se ve truncada por la propia tecnología de la cromatografía líquida convencional, debido fundamentalmente al rango de presiones con el que podían trabajar tanto los equipos (600 bar) como las propias columnas (200 bar). Por lo tanto, para poder seguir evolucionando, era imprescindible realizar cambios en los sistemas

cromatográficos utilizados hasta el momento, es decir, se debían diseñar instrumentos que aprovecharan las ventajas de trabajar con columnas de tamaño de partícula pequeño y salvaran los inconvenientes que presentaban. (Waters, Transferencia de métodos HPLC a UPLC: Revisión de aspectos clave y herramientas disponibles., 2007)

Es en este momento, que aparecen los sistemas Acquity UPLC® de la casa comercial *Waters*. Estos equipos permiten trabajar con columnas de tamaño de partícula de 1,7 y 1,8 μm , con presiones de fase móvil de hasta 1030 bar (15000 psi).

Así, la UHPLC es una nueva tecnología de separación por cromatografía líquida basada en el uso de columnas cromatográficas con tamaños de partícula pequeños (inferiores a 2 μm), con equipos específicamente diseñados para poder trabajar en estas condiciones. (Waters, S. Grumbach, C. Arsenault, & R. McCabe, 2009)

4.1.1. Principales ventajas que aporta trabajar con columnas de tamaño de partícula pequeño.

Sus principales ventajas son la mejora en la eficacia y en la resolución. Además, se amplía el rango de velocidades lineales con el que es posible trabajar sin pérdidas importantes de eficacia, de manera que es posible disminuir sustancialmente el tiempo de análisis.

A continuación, se explica más detalladamente, la justificación teórica de las mejoras presentadas.

- **Mejora en la eficacia y ampliación del rango de velocidad lineal (Ecuación de Van Deemter).**

Cuando se habla de la eficacia en cromatografía, se relaciona, normalmente, con el Número de Platos Teóricos (N). En términos de retención, representa la relación entre el tiempo de retención del compuesto y la anchura de su pico cromatográfico. El tiempo de retención depende de los equilibrios físico-químicos del compuesto entre fase estacionaria y fase móvil. En cambio, la anchura del pico es consecuencia del ensanchamiento de la distribución estadística de las moléculas de analito cuando viajan a lo largo de la columna, es decir, es una medida de la difusión cromatográfica.

En la [Figura 29] se presentan los fenómenos de difusión que sufren las moléculas de analito de los cuales depende la eficacia de la columna.

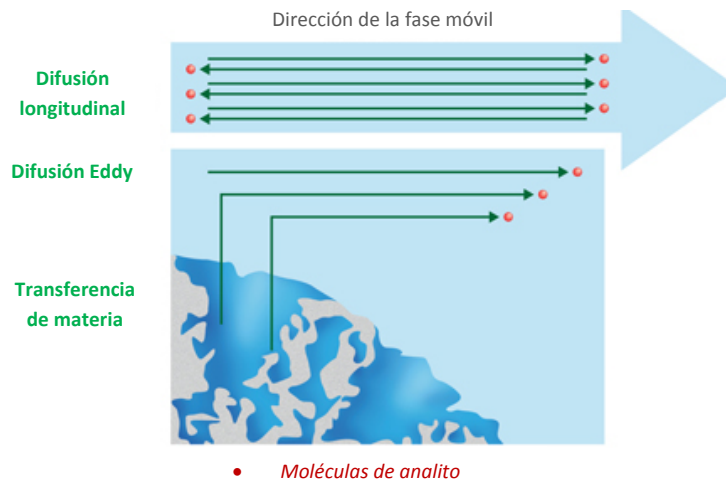


Figura 29. Fenómenos de difusión que sufre la molécula de analito en la columna cromatográfica.
(Waters, S. Grumbach, C. Arsenault, & R. McCabe, 2009)

Como se representa en la [Figura 29], las moléculas de analito en la columna cromatográfica:

- Son transportadas por la fase móvil entre partículas de la fase estacionaria. Durante este movimiento, el fluido sufre una serie de turbulencias que afectan de forma diferente a la trayectoria de las distintas moléculas (*difusión de Eddy*).
- Difunden dentro del flujo de fase móvil, de forma aleatoria provocando una *difusión longitudinal o transversal*.
- Difunden desde la fase móvil dentro y fuera de los poros de fase estacionaria a través del fenómeno de la *transferencia de materia*.

Estos fenómenos, se pueden expresar matemáticamente mediante la Ecuación de Van Deemter [Ecuación 3 y Figura 30]. Ésta es una fórmula empírica que describe la relación entre la velocidad lineal de la fase móvil y la eficacia de la columna (expresada como HETP¹¹), considerando el tamaño de partícula (dp) como una de las variables.

¹¹ HETP: Altura equivalente de plato teórico. Relación entre longitud de la columna (L) y la el número de platos teóricos (N). Así, a misma longitud de columna $HETP = L/N$.

$$\text{HETP} = \underbrace{2\lambda d_p}_A + \underbrace{2\gamma D_m \frac{1}{u}}_B + \underbrace{\left(\frac{\omega}{D_m} d_p^2 + \frac{R}{D_s} d_f^2 \right) u}_C$$

Ecuación 3- Ecuación de Van Deemter (Kazakevich, 2014)

Donde:

- λ : geometría de la partícula (relacionada con el empaquetamiento)
- d_p : diámetro de la partícula de fase estacionaria
- γ, ω i R : constantes
- D_m : coeficiente de difusión del soluto en la fase móvil
- d_f : espesor de la fase estacionaria
- D_s : coeficiente de difusión del soluto en la fase estacionaria
- u : velocidad lineal de la fase móvil

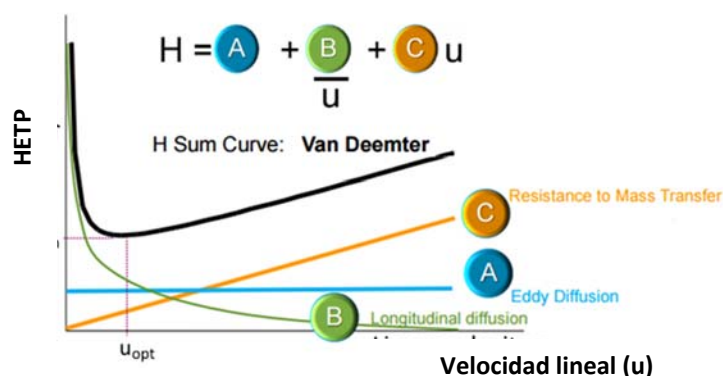


Figura 30. Representación gráfica de la Ecuación de Van Deemter (Waters, S. Grumbach, C. Arsenault, & R. McCabe, 2009)

Como se puede observar en la [Ecuación 3] y en la [Figura 30], el **componente A** (*difusión de Eddy*) es independiente de la velocidad lineal de la fase móvil y depende, exclusivamente, de las características físicas relacionadas con las partículas de la fase estacionaria (tamaño, geometría y empaquetamiento). De manera que, columnas de tamaño de partícula más pequeño, y uniformemente empaquetadas, permiten obtener mejores eficacias (el mínimo del gráfico de Van Deemter baja en el eje de abscisas). En lo que hace referencia al **componente B/u** (*difusión longitudinal y transversal*), está relacionado con la difusión del analito dentro de la fase móvil, así que depende de la velocidad lineal, pero es relativamente independiente del tamaño de la partícula de fase estacionaria. Se puede tomar como una medida de tiempo de permanencia de las moléculas dentro de la columna, ya que cuanto mayor es la velocidad lineal menos importante es la difusión longitudinal y transversal. El **componente C*u**, corresponde a la

resistencia a la transferencia de materia, es decir, hace referencia a la difusión que se produce en las moléculas de analito cuando éstas pasan desde la fase móvil al interior de los poros de la fase estacionaria, interaccionan con ella y regresan a la fase móvil. De manera que, depende directamente, de la velocidad lineal de la fase móvil, es decir, al aumentar ésta, disminuyen las etapas de equilibrio y se pierde eficacia. Por el contrario, la transferencia de materia se ve favorecida con la disminución del tamaño de la partícula de la fase estacionaria en una relación exponencial de grado 2. Así, una disminución del tamaño de partícula provoca una disminución de la pendiente correspondiente al termino C de la ecuación de Van Deemter, haciéndola más plana y provocando un aumento en el rango de velocidades lineales a las que se puede trabajar sin pérdida significativa de la eficacia.

En la [Figura 31], se presentan las curvas de Van Deemter comparando tamaños de partícula. Se marcan las zonas de trabajo habituales para la cromatografía líquida convencional (HPLC) y la UHPLC. Queda reflejado que en UHPLC es posible trabajar con velocidades lineales altas, de manera que se puede reducir claramente el tiempo de cromatograma, sin pérdidas importantes de eficacia.

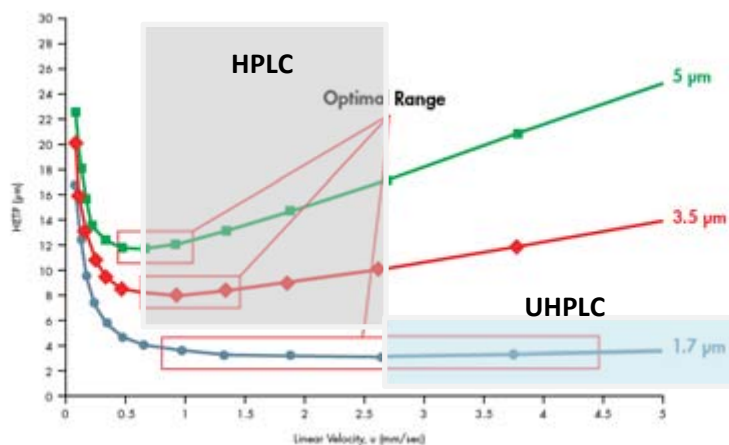


Figura 31. Curvas de Van Deemter según diferentes tamaños de partículas de fase estacionaria. Se marcan las zonas de trabajo para HPLC y UHPLC (Waters, Guía del Sistema ACQUITY UPLC H-Class (Revisión A)., s.f.)

- **Mejora en la resolución.**

La resolución cromatográfica entre dos picos se relaciona con la distancia entre sus máximos teniendo en cuenta sus anchuras. En la [Ecuación 4], se presenta matemáticamente la resolución, tanto expresada como la relación de parámetros cromatográficos directos (tiempo de retención y anchura de los picos) como con el producto de los términos de eficacia, selectividad y factor de retención.

$$R_s = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)} = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{k + 1} \right)$$

Eficacia Selectividad Factor de retención

Ecuación 4. Ecuación de la resolución cromatográfica entre dos picos (1 y 2)

La selectividad y el factor de retención están relacionados con la interacción del analito con la fase estacionaria y la fase móvil, de manera que dependen de la temperatura de trabajo, la composición de la fase móvil y la estructura química de la fase estacionaria. Sin embargo, la eficacia, es una medida de la amplitud de la banda de difusión. Así, como se ha comentado, trabajar con columnas de tamaño de partícula pequeño permite mejorar la eficacia de los picos y, consecuentemente, también permite mejorar la resolución en una relación directamente proporcional a la raíz cuadrada de la eficacia expresada como el número de platos teóricos.

4.1.2. Principales problemas que provoca trabajar con columnas de tamaño de partícula pequeño.

Las ventajas que proporciona trabajar con columnas de tamaño de partícula inferior a 2 µm se contraponen con el incremento exponencial de la presión de trabajo¹² y al posible ensanchamiento extra-columna de las bandas cromatográficas. Estos inconvenientes obligan a una evolución tanto de las columnas como de los sistemas instrumentales a utilizar.

Ha sido necesario desarrollar una tecnología de fabricación de columnas que permita el empaquetamiento con partículas de sílice de diámetro de 2 µm que sea reproducible y que pueda soportar elevadas presiones. Por esta razón, ha sido necesario modificar tanto la estructura de la sílice como de los ligandos que forman la fase estacionaria.

A nivel instrumental, ha sido necesario modificar los sistemas para que puedan trabajar a presiones elevadas disminuyendo al máximo el volumen muerto. Además, se han tenido que incorporar nuevas estrategias de inyección con la finalidad de que sus ciclos sean lo más breves posibles con el mínimo *carryover* e incorporar detectores más rápidos y eficaces capaces de seguir picos de pocos segundos.

¹² Para una longitud de columna fija, la disminución del tamaño de partícula de la fase estacionaria guarda una relación exponencial de grado 3 con el aumento de la presión. Así, en columna que se ha reducido en un factor 2 el tamaño de la partícula, la presión de trabajo se ve aumentada en un factor de 2³=8.

4.1.3. Cambio en el escalado de columnas. Consecuencias cromatográficas.

Las columnas de cromatografía líquida se pueden describir según sus dimensiones: longitud, diámetro interno y tamaño de partícula de la fase estacionaria. Si en la optimización de un método de separación cromatográfica se quiere conseguir mejorar tanto el tiempo del cromatograma como la resolución o la sensibilidad, se puede pensar en cambiar las dimensiones de la columna utilizada, manteniendo la fase estacionaria, es decir, sin modificar la selectividad.

Con la finalidad de poder valorar las consecuencias que provoca realizar cambios en las dimensiones de las columnas, es necesario conocer tanto su **poder de resolución**, como su **capacidad de carga** (limita el volumen de inyección). Además, se debe ajustar el **flujo** para trabajar a la máxima velocidad sin perder eficacia y conocer cómo afectarán dichos cambios en la presión del sistema, que puede ser el factor limitante en función de los valores máximos que soporta tanto la columna como el equipo.

- Poder de resolución de la columna (L/dp)

El poder de resolución de una columna de cromatografía líquida se puede expresar como el cociente de su longitud y el tamaño de partícula (L/dp). Las columnas con relaciones L/dp más elevados, ofrecen mayor eficacia y se utilizan normalmente para las separaciones más difíciles. Calcular esta relación es interesante si se quiere disminuir el tiempo de cromatograma conservando la capacidad de separación.

En la [Figura 32], se representa esta relación en diferentes columnas donde se presentan cambios de longitud y diámetro de partícula.

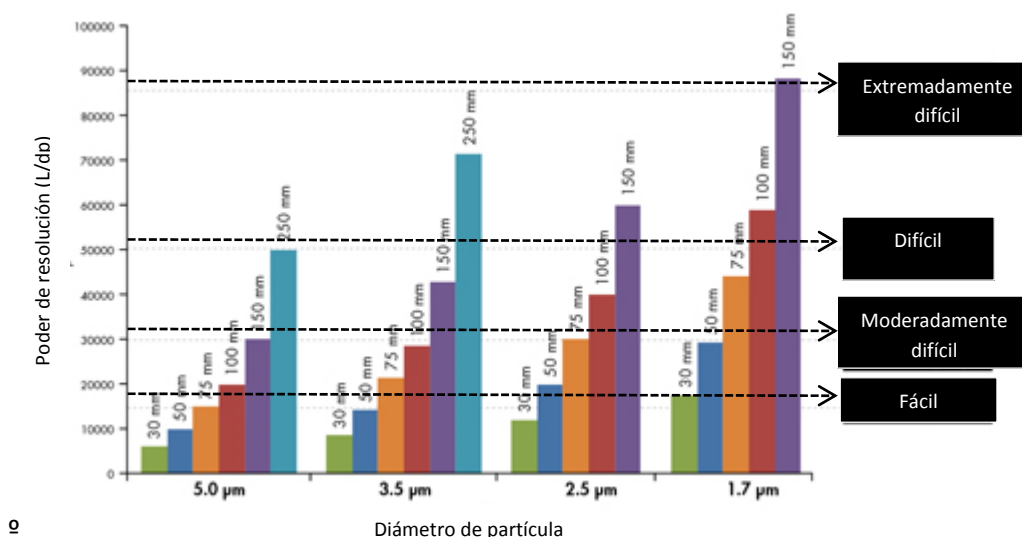


Figura 32. Comparación del poder de resolución de las columnas en función de su longitud y diámetro de partícula. Incluye clasificación en función del tipo de separación. (Waters, S. Grumbach, C. Arsenault, & R. McCabe, 2009)

De su definición se deduce que los máximos poderes de resolución se consiguen con columnas de mínimo tamaño de partícula y máxima longitud de columna.

- **Capacidad de carga de la columna. Escalado geométrico del volumen de inyección**

La capacidad de carga de una columna es la máxima cantidad de muestra que es capaz de separar y depende de su volumen, es decir, del producto de su longitud y su diámetro interno. Así, la capacidad de carga de la columna limita el volumen de inyección, y como norma general, acostumbra a fijarse en como máximo el 5% del volumen de la columna. De manera que en columnas convencionales (100 X 4,6 mm), el volumen de inyección abitual es de 20 µL que representa un 1,2% del volumen de la columna.

Cuando se realiza un cambio en las dimensiones de la columna, se debe valorar si se tiene que escalar el volumen de inyección. En la [Ecuación 5], se presenta la fórmula para realizar el cambio del volumen de inyección en función del volumen de la columna (columna 1 y 2)

$$\begin{aligned} \text{Volumen inyección}_{col 2} &= \text{Volumen inyección}_{col 1} \cdot \frac{\text{volumen}_{col 2}}{\text{volumen}_{col 1}} \\ &= \text{Volumen inyección}_{col 1} \cdot \frac{(\pi \cdot L \cdot DI/2^2)_{col 2}}{(\pi \cdot L \cdot DI/2^2)_{col 1}} \end{aligned}$$

Ecuación 5. Fórmula para realizar el escalado del cambio de volumen de inyección (L: longitud; DI: diámetro interno)

- **Flujo de trabajo. Escalado geométrico y flujo óptimo**

Cuando se cambian las dimensiones de la columna es importante ajustar el flujo de trabajo. Se debe tener en cuenta, que éste es proporcional al cuadrado del diámetro interno de la columna para una determinada velocidad lineal. Este cambio directo es el que proporciona el flujo escalado geoméricamente, ya que no considera la influencia del tamaño de partícula [Ecuación 6].

$$\text{Flujo}_{col 2} = \text{Flujo}_{col 1} \cdot \frac{DI_{col 2}^2}{DI_{col 1}^2}$$

Ecuación 6. Fórmula para realizar el escalado geométrico del flujo de trabajo (DI el diámetro interno de las columnas)

Así, queda claro que trabajar con columnas de menor diámetro interno supone trabajar con flujos de trabajo menores. Pero al disminuir el flujo es posible que éste se sitúe en una zona no óptima según la ecuación de Van Deemter¹³. Por esta razón, normalmente se escala el flujo teniendo en cuenta el tamaño de la partícula. Esta correspondencia permitiría obtener el flujo óptimo de trabajo [Ecuación 7]. Por tanto, gracias a la disminución del tamaño de partícula el flujo óptimo de trabajo aumenta, haciendo disminuir el tiempo de análisis, asegurando no perder eficacia.

$$Flujo_{col\ 2} = Flujo_{col\ 1} \cdot \frac{DI_{col\ 2}^2}{DI_{col\ 1}^2} \cdot \frac{dp_{col\ 1}^2}{dp_{col\ 2}^2}$$

*Ecuación 7. Fórmula para calcular el flujo óptimo de trabajo
(DI el diámetro interno y dp: diámetro de partícula de las columnas)*

En la [Tabla 55] se presentan las consecuencias sobre el poder de resolución, volumen de inyección, flujo de trabajo (escalado geométrico y óptimo), presión y tiempo del cromatograma, cuando se realizan cambios en las dimensiones de las columnas. Se ha considerado una columna de referencia, donde sus dimensiones (longitud o diámetro interno o tamaño de partícula) se les da un valor igual a la unidad. Como volumen de inyección de referencia se consideran 10 µL. Se presentan los cambios que provocan variaciones individuales en las dimensiones de la columna o variaciones múltiples (longitud y diámetro interno; longitud y tamaño de partícula; o cambio en las tres de las dimensiones de la columna).

¹³ Las curvas de Van Deemter cambian con la masa molecular del compuesto. Este efecto se debería tener en cuenta cuando se trabaja con moléculas grandes, como por ejemplo péptidos, de tamaños cercanos a los 2000 Dalton.

Tabla 55. Ejemplo de valoración del tipo de separación según el poder de resolución de la columna utilizada. Se marca en color naranja los cambios realizados, en color azul los casos en que el poder de resolución disminuye y en color rojo la presión máxima.

| Parámetros | Condiciones de referencia | CAMBIOS SOBRE LAS DIMENSIONES DE LA COLUMNA | | | | | |
|------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------------|-----|-----|------|------|---------|
| | | L | DI | Dp | L+DI | L+dp | L+DI+Dp |
| COLUMNA | | | | | | | |
| Longitud (L) | 1 | 1/2 | 1 | 1 | 1/2 | 1/2 | 1/2 |
| Diámetro interno (DI) | 1 | 1 | 1/2 | 1 | 1/2 | 1 | 1/2 |
| Tamaño partícula (dp) | 1 | 1 | 1 | 1/2 | 1 | 1/2 | 1/2 |
| PODER DE RESOLUCIÓN | | | | | | | |
| Relación (L/dp) | 1 | ½ | 1 | 2 | ½ | 1 | 1 |
| CAPACIDAD DE CARGA | | | | | | | |
| Volumen de inyección (µL) | 10 | 5 | 2,5 | 10 | 1 | 5 | 1 |
| FLUJO [ESCALADO GEOMÉTRICO] | | | | | | | |
| Flujo | 1 | 1 | ¼ | 1 | ¼ | 1 | ¼ |
| Presión | 1 | ¼ | 1 | 4 | ½ | 2 | 2 |
| Tiempo de cromatograma | 1 | ¼ | 4 | 1 | ½ | ½ | ½ |
| FLUJO ÓPTIMO | | | | | | | |
| Flujo | 1 | 1 | ¼ | 2 | ¼ | 2 | ½ |
| Presión | 1 | ½ | 1 | 8 | ½ | 4 | 4 |
| Tiempo de cromatograma | 1 | ¼ | 4 | ½ | ½ | ¼ | ¼ |

Como se puede observar en la [Tabla 55]:

- Si se busca **rapidez en el cromatograma**, se puede reducir por una parte la longitud de la columna (ejemplo, columnas ultrarrápidas). En este caso, donde sólo se cambia la longitud, se pierde poder de resolución, por lo tanto, estas columnas no serían adecuadas para separaciones complejas. En cambio, se puede reducir simultáneamente tanto la longitud de la columna como el tamaño de la partícula de la fase estacionaria, de manera que es posible mantener el poder de resolución pero mejorando de forma muy importante el tiempo de cromatograma. Este efecto es lo que sucede con las columnas de UHPLC. Cabe destacar, que si se combina este tipo de columnas con los equipos adecuados (que puedan soportar altas presiones, con mínimos volúmenes muertos de sistema y mínimos ciclos de inyección), se consigue las separaciones de máxima rapidez.
- El cambio del diámetro de las columnas (ejemplo, columnas microbore) se traducen en una reducción en el flujo de trabajo y, consecuentemente, un aumento del tiempo de cromatograma. Sin embargo, a pesar de que este efecto puede resultar negativo, estas columnas se caracterizan porque ofrecen una **mayor sensibilidad** sobre sus homólogas de mayor diámetro interno. Esto se debe al menor volumen de elución de analito que da lugar a un aumento de concentración y el posterior incremento de respuesta en los

detectores de concentración habituales (detectores de concentración como UV, FLU). Además, presentan otra ventaja, que es el **menor consumo de fase móvil** y, consecuentemente, su control termostático es más fácil.

- Relacionados con el volumen de inyección, queda claro que la máxima reducción se relaciona con la disminución tanto de la longitud como del diámetro interno de la columna, llegando a reducirse hasta 10 veces. Por lo tanto, es importante destacar que igual que cuando se trabaja con columnas de HPLC convencionales el volumen de inyección es del orden de los 10-20 μL , cuando se trabaja con columnas de UHPLC los volúmenes de inyección oscilan entre 1-2 μL , volúmenes equivalentes a los que se utilizan en cromatografía de gases.
- Tal y como se ha ido indicando, el cambio del tamaño de partícula es lo que provoca un **mayor aumento en la presión de trabajo**, llegando a aumentar hasta ocho veces cuando la longitud de columna se mantiene constante y se trabaja en el flujo óptimo.

4.2. TRANSFERENCIA DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO DE DETERMINACIÓN DE LOS HAPs DE HPLC A UHPLC.

Cuando se quiere realizar la transferencia de un método cromatográfico de HPLC a UHPLC, se deben tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- Reunir la información del método a partir del cual se quiere realizar la transferencia.
- Seleccionar la nueva columna cromatográfica de la que se debe conocer tanto el relleno (soporte y fase estacionaria), ya que marca la selectividad, como las nuevas dimensiones.
- Comparar los sistemas instrumentales (si es necesario efectuar el cambio). Se consideraran tanto el cambio de volumen muerto de los sistemas, ya que provocarán cambios en el inicio de los gradientes de composición, como los cambios en los sistemas de bombeo, inyección y detección. Es importante tener en cuenta, que la velocidad de adquisición de los datos se fijará en función de la anchura del pico. Como regla general, se considera que un pico está bien definido si está definido entre 10 y 20 puntos. Así si el pico dura 1 segundo es necesario adquirir a 20 puntos/segundo (20 Hz).
- Calcular las condiciones de transferencia directa del método mediante el escalado tanto del flujo como del volumen de inyección, del cálculo del flujo óptimo, además de la adaptación de los gradientes de elución.
- Evaluar los resultados que se obtienen de la transferencia directa y optimizar la separación, si se considera necesario.

Como método de partida, se propone uno de los métodos ensayados durante la optimización de los 16 EPA-HAPs [Tabla 56]. Este método no coincide exactamente con el método definitivo [Tabla 33] aunque el cambio es mínimo. En este caso, las condiciones iniciales son 50:50 acetonitrilo/agua MilliQ, en lugar de 48:52 del método definitivo y, el inicio del segundo cambio de gradiente comienza en el minuto 7, en lugar de en el minuto 5.

En estas condiciones también es posible separar los 16 EPA-HAPs y el tiempo de elución del último compuesto (IP) es de aproximadamente 14,5 min.

En lo que hace referencia a la columna (Pursuit 3 PAH (10 cm x 4,6 mm X 3 µm)), como ya hemos descrito anteriormente, tiene una fase estacionaria específica para la separación de esta familia de compuestos con una base sílica ligada poliméricamente a grupos C18. En cuanto a las dimensiones, es una columna convencional con un poder de resolución de 33333, que la sitúa en la zona de las columnas destinadas a separaciones entre moderadamente difíciles y difíciles.

Este método, como se ha indicado, se ha desarrollado en un cromatógrafo Alliance 2690 de Waters. Este sistema de HPLC convencional está equipado con un sistema de bombeo de tipo cuaternario que cuenta con una bomba que realiza la mezcla a baja presión. El volumen muerto del sistema (desde donde se mezcla la fase móvil hasta que se llega al detector) es de aproximadamente de 1 mL.

Tabla 56. Condiciones cromatográficas utilizadas para realizar la transferencia del método cromatográfico de HAPs de HPLC a UHPLC.

| Condiciones cromatográficas HPLC-FLU: | |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Columna | Pursuit 3 PAH (100 X 4,6 mm, 3 µm) |
| Volumen de inyección | 20 µL |
| Temperatura columna | 30°C |
| Flujo | 1,5 mL/min |
| Eluyente | [A] Agua MilliQ; [B] Acetonitrilo (ACN) |
| Gradiente elución | 0 min: [A] 50% [B] 50% 7 min: [A] 35% [B] 65% - Curva: 6 (lineal) 9-16 min: [A] 0% [B] 100% - Curva: 6 (lineal) 16,1-19 min: [A] 50% [B] 50% (Estabilización en condiciones iniciales) |
| Tiempo de cromatograma | 19 min |
| Condiciones detección [1] | Canal 1: 280/340 [Na, Ace, Fl] Canal 2: 250/376 [Fe, An] Canal 3: 285/260 [Pa] Canal 4: 296/405 [BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP] |
| Condiciones detección [2] | Canal 1: 280/340 [Na, Ace, Fl] Canal 2: 296/405 [BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP] Canal 3: 333/390 [Pyr] Canal 4: 318/500 [BjF, IP] |

Para realizar la transferencia del método se propone trabajar con una columna de UHPLC tipo BEH C18 (5 cm X 2,1 mm X 1,7 µm). Esta es una columna corta (5 cm) de UHPLC (tamaño de partícula de 1,7 µm) con un diámetro interno estrecho (2,1 mm). Aunque si se calcula su poder de resolución ($L/dp=29412$) es prácticamente equivalente a la columna del método de partida.

La principal diferencia son las fases estacionarias. La fase estacionaria de la columna BEH, se caracteriza por ser una fase híbrida que dispone de puentes etileno (*BEH: Ethylene Bridge Hybrid*) entre algunos de los átomos de silicio. Esto hace que la fase estacionaria sea mecánica y químicamente más estable, sobre todo cuando se trabaja a pHs extremos en los que la sílice es fácilmente protonable (pH ácido) o se puede solubilizar (pH básico). No es una columna diseñada específicamente para el análisis de los HAPs, por lo que su selectividad puede ser diferente a la del método de partida. Sin embargo, se ha decidido comenzar la optimización con esta columna porque la casa comercial *Waters* dispone de aplicaciones para separar HAPs con este tipo de columnas y, además, la oferta de columnas ensayadas para la separación de HAPs con tamaños de partícula sub-2 μm es muy baja.

En lo que hace referencia al sistema cromatográfico, el análisis por UHPLC-FLU se realiza con un equipo Acquity UPLC® de *Waters*. Este equipo permite trabajar con presiones de hasta 1030 bar (15000 psi), por lo que es adecuado para aprovechar al máximo las mejoras cromatográficas relacionadas con las columnas de tamaño de partícula sub 2 μm . Es un equipo que está compuesto por un sistema de bombeo binario que cuenta con dos bombas que realizan la mezcla a alta presión. En este caso, el volumen muerto del sistema es de 0,13 mL, por lo tanto, se ha reducido casi 10 veces respecto al sistema cromatográfico de HPLC convencional. Esta diferencia de volúmenes provocará además de una disminución del ensanchamiento de los picos, que el tiempo en que el gradiente llega a la columna sea diferente.

4.2.1. Cálculos de transferencia de método (escalado de columnas).

Para realizar la transferencia de método de forma rápida, se puede recurrir a la aplicación informática de transferencia de métodos que dispone *Waters (Acquity UPLC column calculator)*. Esta aplicación realiza el cambio de escalado considerando tanto las condiciones del método de partida como hacia el que se quiere realizar la transferencia. En ambos casos, se consideran tanto las dimensiones de la columna como el equipo utilizado. En ningún caso tiene en cuenta las diferencias en las fases estacionarias que marcan la selectividad, por lo que queda claro, que los métodos propuestos por calculadora son orientativos y pueden servir de métodos de partida para la posterior optimización.

El software propone dos métodos, uno que no considera el cambio en el tamaño de partícula, es decir, propone un escalado geométrico del flujo [Ecuación 6], y otro que incluye el cambio en el tamaño de partícula (incluye el flujo óptimo [Ecuación 7]). En ambos casos, con el flujo propuesto, ajusta la tabla de gradientes para mantener el mismo número de volúmenes de columna de solvente que pasará por la columna, es decir, **en ambos casos** (método de partida y método transferido) **la duración de cada etapa del gradiente debe ser equivalente**. También incluye el nuevo volumen de inyección calculado con la [Ecuación 5] y la presión esperada en cada una de las etapas.

En lo que hace referencia a la transferencia de la duración de cada etapa del gradiente, primero se deben calcular en el método de partida. La duración de cada etapa del gradiente [Ecuación 8] corresponde a la relación entre el volumen del eluyente que circula por la columna en cada etapa y el volumen de la columna.

$$\text{Duración del gradiente}_{\text{escalón } x} = \frac{\text{Volumen de gradiente}}{\text{Volumen de columna}} = \frac{\text{flujo} \cdot \text{tiempo del gradiente}}{\pi \cdot \left(\frac{DI}{2}\right)^2 \cdot L}$$

Ecuación 8. Fórmula de cálculo de la duración de un determinado escalón del programa, donde DI es el diámetro interno y L es la longitud de la columna.

Como premisa en la transferencia del método, se considera que la duración de cada etapa del gradiente debe mantenerse al transferir el método. Así, para calcular las condiciones equivalentes es necesario recalcular el nuevo tiempo de cada etapa del programa considerando el nuevo volumen de columna y el nuevo flujo de trabajo para cada una de las etapas del gradiente.

En la [Figura 33] se presentan los datos de entrada incluidos en la calculadora para realizar la transferencia del método cromatográfico. Se incluye las condiciones de partida y las nuevas condiciones para el método de transferencia.

El software calcula con los datos introducidos, tanto del poder de resolución de las dos columnas (L/dp) como su volumen, así como la duración de las etapas del gradiente del método inicial (que se deben mantener en el método de transferencia).

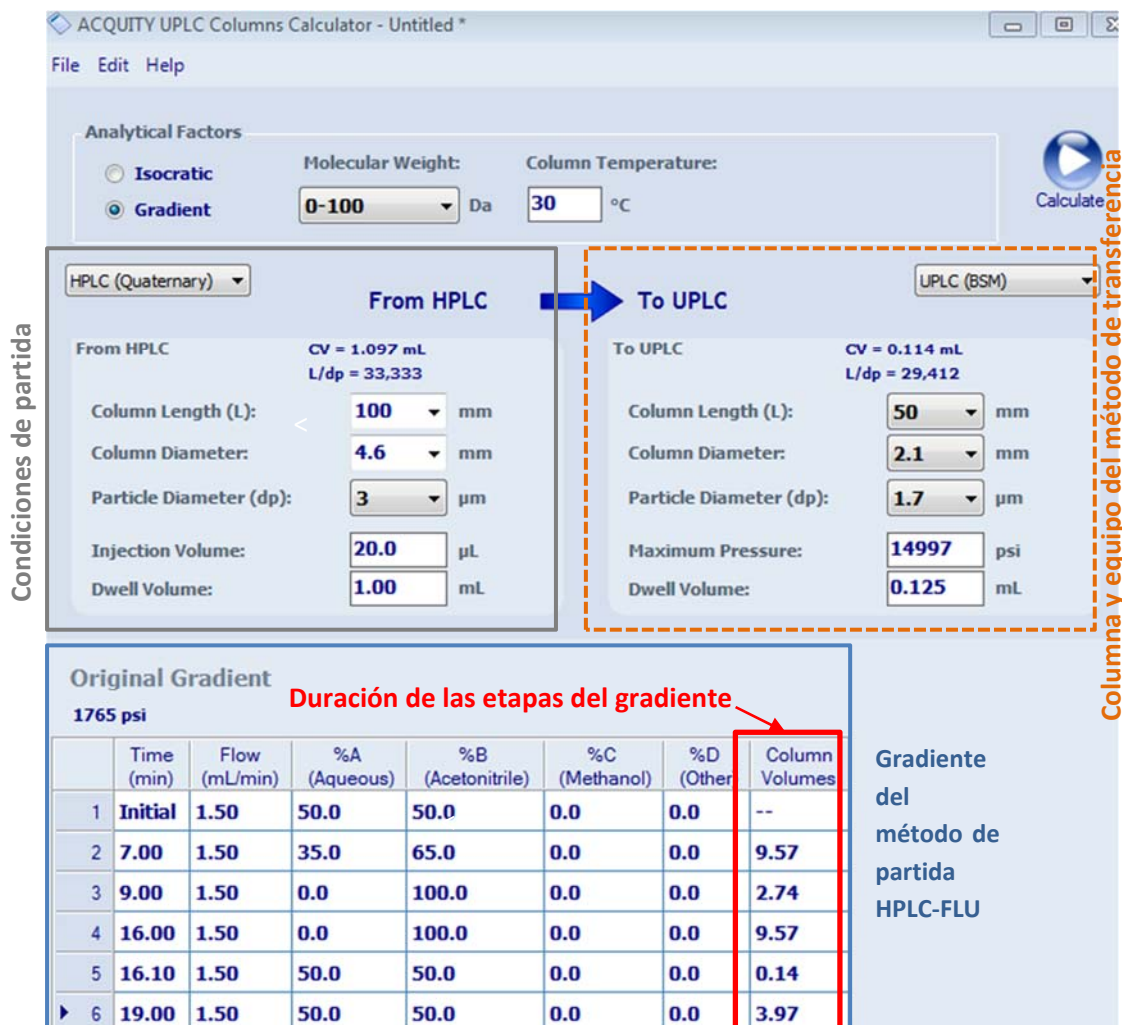


Figura 33. Captura de pantalla del software de transferencia de métodos (Acquity UPLC Column calculator) de Waters. Datos de entrada. Se introducen los valores del método de partida y las condiciones de columna y equipo del método al que se quiere transferir, es decir, se incluyen las dimensiones de la columna BEH (50 X 2,1 mm X 1,7 µm).

Si se aplica la transferencia, se proponen dos nuevos posibles métodos: uno que considera un cambio geométrico del flujo (0,31 mL/min) y otro que considera el flujo óptimo según el tamaño de partícula (0,55 mL/min). El primero de los métodos propuestos supone una reducción del tiempo de cromatograma del 50%, mientras que el segundo del 80%.

Si tenemos en cuenta el volumen de inyección, después de realizar el escalado con el cambio de volumen de la columna se pasa de 20 µL a 2,1 µL.

En la [Figura 34], se presentan los dos métodos obtenidos y el cálculo de los nuevos gradientes manteniendo la duración de las etapas del gradiente de partida.

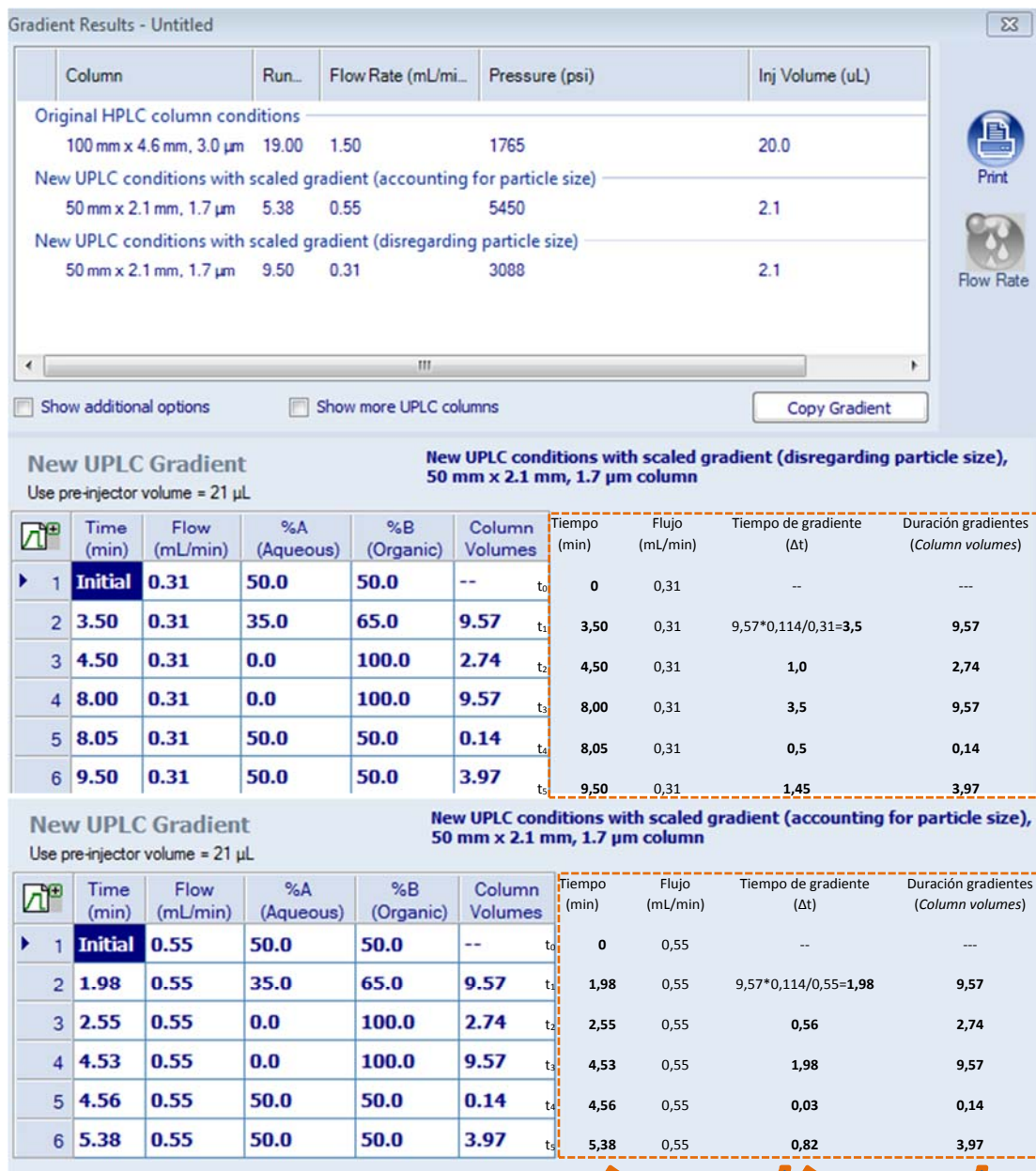


Figura 34. Captura de pantalla del software de transferencia de métodos (Acquity UPLC Column calculator) de Waters. Resultado de la transferencia de método a la columna BEH (50 X 2,1 mm X 1,7 μm). Se incluyen tablas con los cálculos que realiza el software para hacer el escalado de los gradientes.

En la [Figura 35], se incluye el cromatograma obtenido al analizar un patrón de 100 mg/L de los 16 EPA-HAPs disuelto en acetonitrilo, con el método obtenido directamente de la transferencia con el flujo óptimo (0,55 mL/min). En este caso, la detección se realiza con un detector de ultravioleta de longitud de onda fija a 254.

Para conocer el orden de elución de los compuestos a estudio en la columna BEH C18, se consulta la aplicación que propone Waters para la separación de esta familia de compuestos en esta columna (Benventuri, M. E.). En este caso, también propone trabajar con una fase móvil de agua MilliQ y acetonitrilo, pero con un flujo de 0,4 mL/min. El gradiente también es diferente,

se inicia con un porcentaje de acetonitrilo del 66% y aumenta hasta el 90% durante 3,5 min. En estas condiciones, el orden de elución de los 16 EPA-HAPs coincide con el obtenido en la columna Pursuit 3 PAH, a excepción de las parejas de compuestos: Ace-Flu; BaA-Cry, BghiP-IP que invierten su orden de elución.

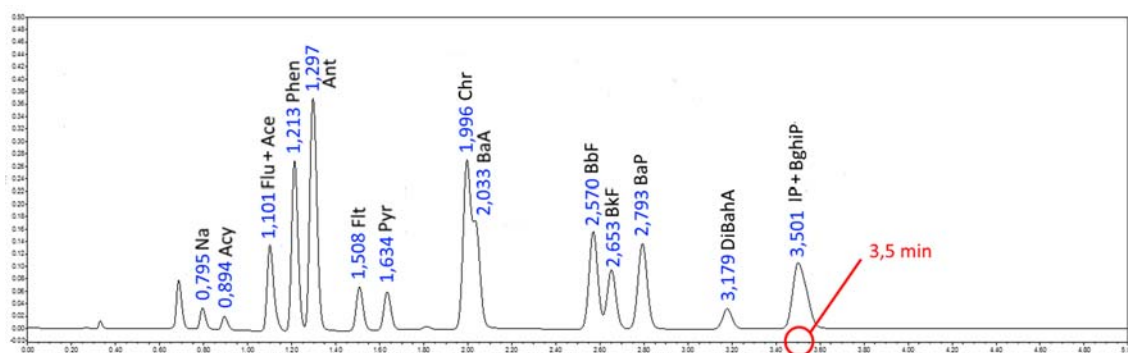


Figura 35. Cromatograma de un patrón de los 16 EPA-HAPs (100 mg/L) analizado con el método cromatográfico obtenido directamente de la transferencia con el flujo óptimo.

Como se puede observar, el último de los 16 EPA-HAPs se eluye en un tiempo de 3,5 min. De manera que se consigue una reducción del 68% del tiempo de cromatograma. Aunque, cabe destacar que, en la columna BEH C18 utilizada, no se consiguen separar correctamente las parejas de compuestos: Cry-BaA; BbF-BkF y IP-BghiP, obteniéndose en todos los casos resoluciones inferiores a 1,5. Además, los compuestos fluoranteno y acenafteno quedan totalmente solapados. Por lo tanto, el método obtenido por transferencia directa del método original de HPLC-FLU no es capaz de separar los 16 EPA-HAPs. Aunque es importante tener en cuenta que la transferencia se ha realizado con una columna de fase estacionaria diferente, por lo que, era de esperar que cambiase la selectividad.

Se ha ensayado el método bibliográfico y tampoco permite separar a línea de base las parejas de compuestos indicadas, aunque los separa ligeramente mejor debido al mayor poder de resolución de la columna propuesta en la aplicación. En este caso la columna disponible es de 5 cm mientras que la propuesta por Waters es de 10 cm.

Por esta razón, y debido a la no disponibilidad de la columna de 10 cm, se propone seguir la optimización del método de UHPLC con una nueva columna de tamaño de partícula sub-2 μm .

4.3. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO DE DETERMINACIÓN DE LOS 16 EPA-HAPs POR UHPLC.

A partir de los resultados obtenidos de la transferencia del método de separación de HPLC con una columna Pursuit 3 PAH (100 X 4,6 mm X 3 μm) a UHPLC con una columna BEH C18 (50 X 2,1 mm X 1,7 μm), parece factible la reducción drástica del tiempo de cromatograma. Pero si se

quieren separar las parejas críticas de compuestos (Ace-Flu; Cry-BaA; BbF-BkF; BghiP-IP) es imprescindible modificar o la longitud o la selectividad de la columna de UHPLC.

Así, se optimizará la separación en UHPLC con una nueva columna. Se ajustaran los gradientes y la composición de la fase móvil. Por otra parte, también es necesario optimizar la sensibilidad (punto que no se considera en la transferencia de método) adaptando tanto el volumen de inyección como las condiciones de detección.

4.3.1. Optimización de la separación.

- **Columna y gradientes.**

Como se ha especificado, la transferencia HPLC a UHPLC se ha realizado a una columna BEH C18 (50 X 2,1 mm; 1,7 μm), la cual, se ha comprobado que no es capaz de separar correctamente algunos de los compuestos a estudio. Por esta razón, se prefiere modificar la fase estacionaria y buscar una columna específica para la separación de esta familia de compuestos, como lo era la columna de partida (Pursuit 3 PAH (100 x 4,6 mm; 3 μm)).

Después de realizar una búsqueda bibliográfica exhaustiva, se ha observado que existen pocas columnas de UHPLC (con tamaño de partícula sub 2 μm) específicas para la separación de los HAPs. Se ha encontrado, que en la mayoría de los casos, la columna propuesta es una *Zorbax Eclipse PAH*, fabricada y comercializada por *Agilent*.

Las columnas *Zorbax Eclipse PAH* constituyen un modelo de columnas que se caracterizan por haber sido fabricadas específicamente para la separación de los HAPs y, por lo tanto, aseguran la separación de isómeros geométricos como los isómeros del benzofluoranteno (BbF, BkF y BjF). Su fase estacionaria es equivalente a la de la columna Pursuit 3 PAH, propuesta en el método de HPLC. La fase estacionaria de ambas columnas es de sílice ultrapura con cadenas de C18 unidas poliméricamente. En la [Tabla 57] se presentan las especificaciones indicadas por el fabricante para ambas fases estacionarias de HAPs propuestas.

Tabla 57. Especificaciones de las columnas Pursuit 3 PAH y Zorbax Eclipse PAH (Agilent Technologies, 2015).

| Fase estacionaria | Tamaño de poro | Área superficial | % Carbono | Endcapped |
|--------------------|----------------|-----------------------|-----------|-----------|
| Pursuit 3 PAH | 200 Å | 200 m ² /g | 22 % | No |
| Zorbax Eclipse PAH | 95 Å | 160 m ² /g | 14 % | No |

Como se puede observar en la [Tabla 57], en lo que hace referencia a la fase estacionaria, ambas columnas tienen áreas superficiales del mismo orden y son “no endcapped”, es decir, que los grupos silanol libres no han estado funcionalizados con trimetilsilano. Hay que destacar, el

elevado porcentaje de carbono que poseen ambas columnas (22% y 14%, respectivamente), que es más elevado que el de las columnas C18 convencionales que suele estar del orden del 10%. Este porcentaje más elevado de carbono junto con su carácter polimérico, es lo que las hace más selectivas respecto a las moléculas planas.

En lo que hace referencia a las dimensiones, la única columna *Zorbax Eclipse PAH* que es capaz de soportar presiones de hasta 1200 bar (>15000 psi) es la columna *Zorbax Eclipse PAH RRHD (Rapid Resolution High Definition)* que está disponible en las dimensiones: 50 X 3 mm; 1,8 µm.

Si se compara con la columna BEH utilizada en la transferencia cambia tanto el diámetro interno (de 2,1 mm a 3 mm) como ligeramente el tamaño de partícula (de 1,7 µm a 1,8 µm). Así, es necesario cambiar tanto el flujo de trabajo como el volumen de inyección, debido al nuevo escalado de columna. En el caso del volumen de inyección, se podría aumentar hasta 4 µL pero se decide continuar la optimización con 2 µL. En el caso del flujo de trabajo, aunque el flujo óptimo de la columna BEH era 0,55 mL/min, se decide introducir un flujo intermedio entre el geométrico y el óptimo de 0,4 mL/min. Así, el flujo obtenido sin considerar el pequeño cambio en el tamaño de partícula es de 0,77 mL/min, que se utilizará para optimizar la separación. Se decide trabajar con este flujo y no el óptimo para evitar que la presión de la columna supere los 9000 psi, y poder tener un margen de seguridad cuando la columna vaya envejeciendo. Es importante destacar, que aunque el flujo propuesto es mayor, la velocidad lineal se reduce de 0,19 cm/s a 0,18 cm/s, debido a la mayor sección de la columna *Zorbax*. Esto afecta negativamente en el tiempo total de cromatograma.

Así, con la nueva columna propuesta, utilizando como fase móvil agua MilliQ y acetonitrilo (igual que en el método de partida de HPLC) y con un flujo de trabajo de 0,77 mL/min, se ensayan diferentes gradientes con la finalidad de buscar la mejor separación de los 16 EPA-HAPs.

En la [Tabla 58], se presentan los métodos ensayados y en la [Figura 36] los cromatogramas obtenidos al inyectar 2 µL de un patrón conjunto de los 16 EPA-HAPs de 100 mg/L preparado en acetonitrilo. En este caso, la detección se realiza por ultravioleta a 254 nm.

Tabla 58. Tabla de gradientes ensayados en la columna Zorbax Eclipse PAH. Optimización

| Método | %inicial de ACN | Velocidad gradiente (1) [Δ%B/min] | Tiempo de inflexión [min] | Velocidad gradiente (2) [Δ%B/min] | Tiempo final gradiente (2) |
|--------|-----------------|-----------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| 1 | 50 | 6,5 | 2,32 | 26,5 | 3,64 |
| 2 | 50 | 11,4 | 1,85 | 16,2 | 3,64 |
| 3 | 40 | 10,8 | 2,32 | 26,5 | 3,64 |
| 4 | 50 | 8,1 | 1,85 | 19,6 | 3,64 |
| 5 | 50 | 9,4 | 1,59 | 17,1 | 3,64 |
| 6 | 50 | 6,5 | 2,32 | 22,7 | 2,98 (*) |

(*) El método 6 consta de un 3er. Gradiente que se inicia en 2,98, aumentando a una velocidad de 30,3 %B/min y que finaliza a 3,64 min.

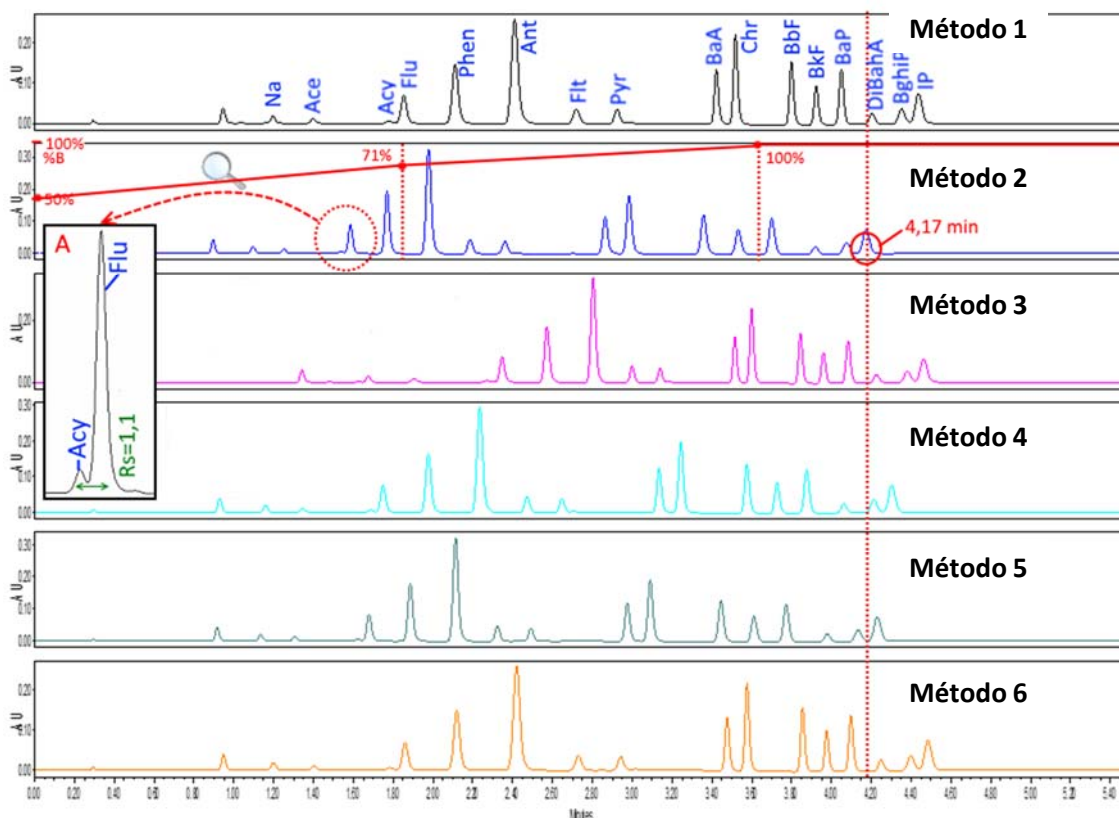


Figura 36. Cromatograma de un patrón de los 16 EPA-HAPs (100 mg/L) analizado en las diferentes condiciones propuestas en la [Tabla 58]

Como se puede observar en la [Figura 36], los seis métodos propuestos permiten la separación de los 16 EPA-HAPs en un tiempo inferior a 5 min. En todos los casos, es posible separar con una resolución superior a 1,5 todas las parejas críticas: BaA-Cry, BbF-BkF y BghiP-IP. La pareja de compuestos Ace-Flu, que se eluía conjuntamente con la columna BEH, con la columna Zorbax es posible su separación ($R_s \approx 1$). Por lo tanto, se decide escoger el método que permite separar los compuestos más rápidamente que corresponde con el gradiente propuesto en el Método 2 [Tabla 58].

Paralelamente, con el Método 2 escogido [Tabla 58], se decide aplicar gradientes no lineales. Aunque se debe tener en cuenta que este tipo de gradientes se pueden realizar con los equipos de la casa comercial *Waters*, pero no en los de *Agilent* que sólo permite trabajar con gradientes lineales. Por lo tanto, esto podría suponer una limitación a la hora de realizar transferencia de métodos a otros equipos.

En la [Figura 37], se presentan los resultados obtenidos al analizar el mismo patrón conjunto de los 16 EPA-HAPs de 100 mg/L, con el gradiente propuesto en el método 2 [Tabla 58], pero utilizando gradientes no lineales.

Pendiente de 3: gradiente cóncavo (velocidad del inicio del gradiente es superior que al final del mismo)

Pendiente de 9: gradiente convexo (velocidad del inicio del gradiente es inferior que al final del mismo)

Cabe destacar que a los gradientes lineales, en los sistemas *Waters*, les corresponde una pendiente de 6.

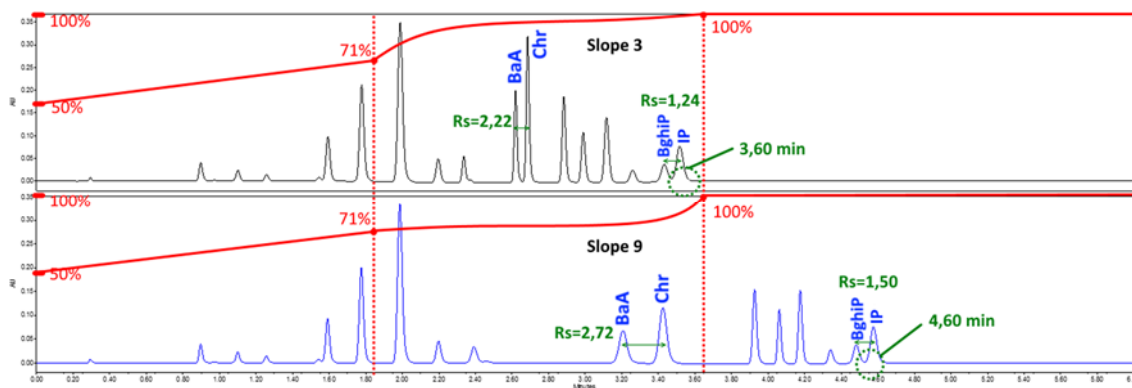


Figura 37. Cromatograma de un patrón de los 16 EPA-HAPs (100 mg/L) analizado en las condiciones correspondientes al método 2 [Tabla 58] pero cambiando en gradiente lineal por gradientes cóncavos (pendiente 3) o convexo (pendiente 9)

Como era de esperar, utilizando un gradiente cóncavo, se disminuye la separación entre los picos, pero por el contrario se consigue reducir el tiempo de cromatograma a menos de 4 min. En el caso del gradiente convexo, los resultados son inversos, es decir, aumenta tanto la separación entre los picos como en el tiempo de cromatograma.

Como la mejora de tiempo obtenida no es demasiado significativa, se decide continuar trabajando con gradientes lineales para darle mayor versatilidad al método cromatográfico puesto a punto.

- **Composición del modificador orgánico de la fase móvil.**

En lo que hace referencia a la composición de la fase móvil, hasta el momento, tanto en HPLC como en UHPLC se ha trabajado en fase inversa utilizando agua MilliQ y acetonitrilo como fase móvil.

En el método optimizado por UHPLC, se ha estudiado la posibilidad de incorporar el metanol como modificador orgánico de la fase móvil, con la finalidad de aprovechar la diferente selectividad que se puede obtener con este disolvente debido a su diferente polaridad y la posibilidad de formar puentes de hidrógeno. Sin embargo, es importante tener en cuenta que

la diferencia de viscosidad entre los dos disolventes (ACN: $\mu=0,37$ cP; MeOH: $\mu=0,60$ cP), provocará que aumente la presión de trabajo al aumentar la proporción de metanol en la fase móvil.

En la [Figura 38], se presentan los resultados obtenidos al variar la composición del componente orgánico de la fase móvil (100% ACN; 50:50 ACN/MeOH; 100% MeOH). En todos los casos, se han inyectado 2 μL de un patrón conjunto de los 16 EPA-HAPs de 10 mg/L preparado en acetonitrilo, en el gradiente correspondiente al Método 2 descrito en la [Tabla 58]. La detección se realiza por UV a 254 nm.

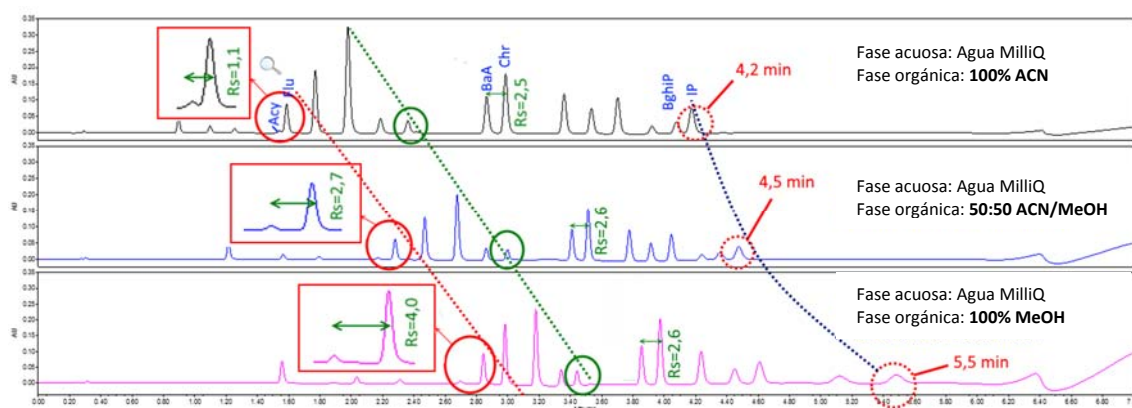


Figura 38. Cromatogramas de un patrón de los 16 EPA-HAPs (10 mg/L) analizado en las condiciones correspondientes al método 2 [Tabla 58] pero cambiando la composición del componente orgánico de la fase móvil: 100% ACN; 50:50 ACN/MeOH; 100% MeOH.

Como se puede observar, la proporción de metanol en la fase móvil tiene un efecto directo en el tiempo de retención de los analitos, obteniéndose una diferencia de hasta 1,3 min en el caso del IP (20% respecto al tiempo total del cromatograma). También se observa un ensanchamiento de los últimos picos eluidos cuanto mayor es la proporción de metanol. En cambio, si se tiene en cuenta la resolución de la pareja crítica acenafteno-fluoreno, ésta aumenta de forma significativa al aumentar la proporción de metanol en la fase móvil.

Por esta razón, para llegar a un compromiso entre el tiempo de cromatograma y la resolución de los picos, se utilizará como modificador orgánico la mezcla 50:50 ACN/MeOH.

Con la finalidad de determinar la robustez asociada a la exactitud de la preparación de la mezcla, se decide inyectar un patrón conjunto de los 16 EPA-HAPs de 40 ng/mL preparado en acetonitrilo¹⁴ variando $\pm 10\%$ la proporción de cada uno de los disolventes. Así, se ensayan las siguientes proporciones de componente orgánico de la fase móvil: 45:55 y 55:45 MeOH/ACN. Los resultados obtenidos se comparan con los que supone trabajar con 100% de ACN o de MeOH.

En la [Figura 39], se presentan una ampliación de la zona de elución correspondiente a los compuestos entre BbF y BghiP

¹⁴ Se ha trabajado con el patrón preparado en 50:50 ACN/MeOH, obteniéndose los mismos resultados.

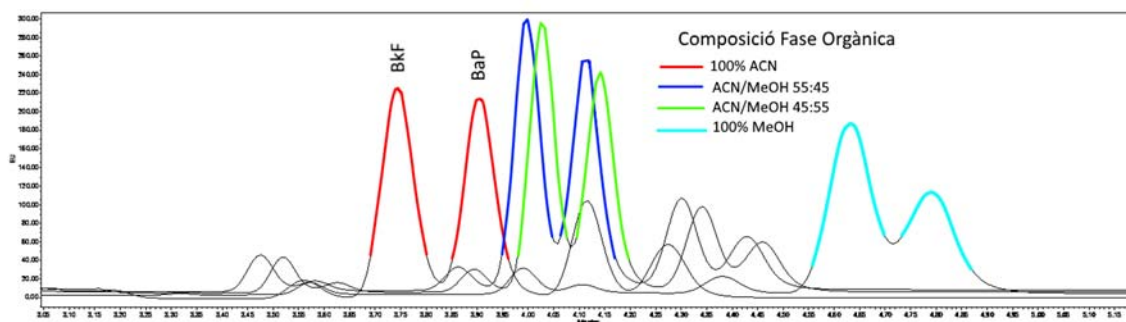


Figura 39. Estudio de la exactitud de la preparación de la mezcla del componente orgánico de la fase móvil. Cromatogramas de un patrón de los 16 EPA-HAPs (40 ng/mL) analizado en las condiciones correspondientes al método 2 [Tabla 58] con detección de fluorescencia (296/405). Ampliación de la zona del cromatograma donde se eluyen los compuestos BbF-BkF-BaP-DiBahA-BghiP.

Como se puede observar, una variación del 10% en la preparación de la mezcla 50:50 ACN/MeOH como modificador orgánico de la fase móvil, supone una variación inferior al 1% en el tiempo de retención de los analitos, sin verse modificada su resolución. Sin embargo, es importante destacar que la proporción 50:50 sitúa los picos en el punto central entre las proporciones que suponen el 100%, pero ligeramente desplazados hacia la proporción de 100% ACN. Este hecho implica que los errores en la preparación del modificador orgánico de la fase móvil supondrían una mayor variación en el tiempo de retención de los compuestos en el caso de que la proporción de metanol fuese mayor a la fijada.

4.3.2. Optimización de la sensibilidad.

- **Volumen de inyección.**

Como se ha comentado anteriormente, la transferencia del método de la columna BEH C18 (50 X 2,1 mm; 1,7 μ m) a la columna Zorbax Eclipse PAH (50 X 3 mm; 1,8 μ m), permitiría un aumento del doble en el volumen de inyección, debido al aumento del diámetro interno de la columna.

Si se estudia la relación señal/ruido de algunos de los compuestos a estudio eluidos en diferentes puntos del cromatograma (Na, Pyr, BaP y DiBahA) al inyectar el doble de volumen en la columna Zorbax (2 μ L) que en la columna BEH (1 μ L), se observa que la sensibilidad se incrementa como mínimo en un factor de 3 en todos los compuestos, sin observarse en ningún momento fenómenos de saturación de la columna [Figura 40].

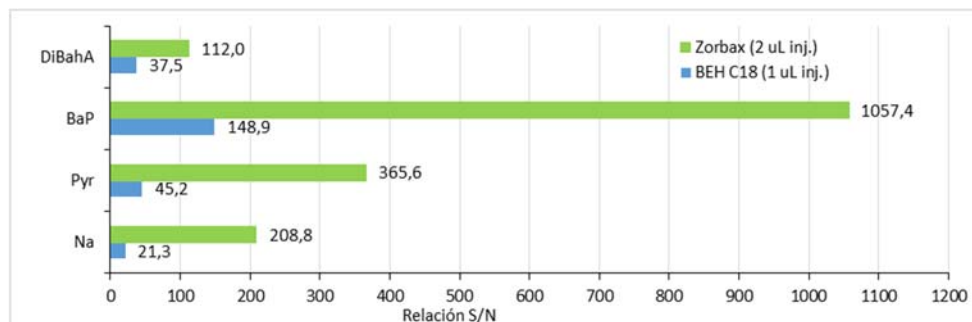


Figura 40. Estudio del volumen de inyección en las dos columnas ensayadas. Relación señal/ruido (S/N) de un patrón conjunto de los 16 EPA-HAPs de 10 mg/L (detección UV a 254 nm) cuando se inyectan 2 μ L en la columna Zorbax Eclipse PAH (50 X 3 mm, 1,8 μ m) y 1 μ L en la columna BEH C18 (50 X 2,1 mm, 1,7 μ m).

Teniendo en cuenta estos resultados, se podría plantear la posibilidad de aumentar más el volumen de inyección. Cabe destacar que si el volumen de inyección en la columna de partida utilizada en el método de HPLC (Pursuit 3 PAH (100 X 4,6; 3 μ m)) son 20 μ L, los volúmenes obtenidos de la transferencia de método directa a las nuevas columnas serían, respectivamente, 2 μ L en la columna BEH C18 y 4 μ L en la columna Zorbax. Aunque se desestima este cambio para evitar problemas de saturación en el caso de trabajar con concentraciones de patrón más elevadas y para disminuir el riesgo de efecto matriz, en el caso de análisis de muestras complejas.

Además, como estrategia de inyección en el sistema Acquity UPLC[®] se ha escogido la conocida como PLNO (*Partial Loop Needle Overfill*), opción recomendada por el mismo fabricante cuando se trabaja con volúmenes de inyección inferiores al *loop* de inyección (en este caso es de 10 μ L). Este modo de inyección consume un volumen adicional respecto al fijado como volumen de inyección con el objetivo de acondicionar el *loop* previamente con la muestra antes de la inyección y disminuir el *carry over*. Así, una inyección de 2 μ L, supondría un consumo de muestra de 20 μ L. Este punto puede ser un factor limitante cuando se dispone de muy poco volumen de muestra. Así, se fija el volumen de inyección en 2 μ L.

- **Detección de fluorescencia cuando se trabaja en condiciones de UHPLC.**

El detector de fluorescencia empleado para el análisis por UHPLC corresponde al modelo de Acquity UPLC®, de la casa comercial *Waters*. Este modelo tiene la capacidad de trabajar con frecuencias de muestreo de hasta 80 Hz permitiendo la caracterización completa de los picos estrechos de separación típicos de separaciones de UHPLC. Además, también dispone de una cubeta de flujo de bajo volumen (< 2 µL) con iluminación axial para una mayor absorción de luz y una mayor sensibilidad.

Este modelo, al igual que los otros detectores de fluorescencia de la casa comercial *Waters*, puede trabajar simultáneamente con hasta 4 canales de detección diferentes. Esta forma de detección se había propuesto para la determinación de los HAPs en el método cromatográfico de HPLC-FLU, para evitar el cambio de ventanas de detección en un mismo canal, que puede llevar a la no detección de picos de interés si se produce un desplazamiento de los tiempos de retención.

Sin embargo, esta forma de trabajar supone una limitación técnica cuando se tienen separaciones de UHPLC con picos estrechos y cromatogramas muy cortos, debido a que al aumentar el número de canales activos en un mismo método, disminuye drásticamente la capacidad de adquisición de los datos. Así, se pasa de 20 puntos/s cuando se trabaja con un solo canal a tan sólo 1 punto/s cuando se trabaja con tres de los cuatro canales activos. Cromatográficamente, esto se refleja en una menor definición de los picos registrados, provocando una pérdida importante de resolución.

En la [Figura 41] se presenta el efecto que supone la variación en la velocidad de adquisición cuando se inyectan 2 µL de un patrón conjunto de 400 ng/mL de los 16 EPA-HAPs, preparado en ACN.

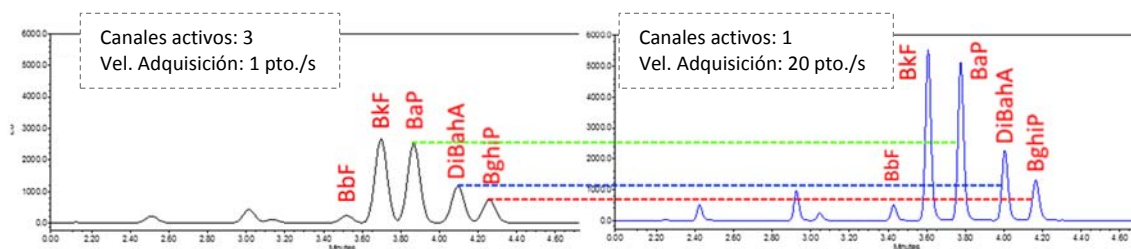


Figura 41. Estudio de la velocidad de adquisición en separaciones de tipo UHPLC. Análisis de un patrón de 400 ng/mL de los 16 EPA-HAPs por UHPLC con columna Zorbox Eclipse PAH (50 X 3 mm; 1,8 mm) con el método 2 [Tabla 58] con detector de fluorescencia Acquity UPLC® (296/405).

Como se puede apreciar en la [Figura 41], la pérdida de resolución es evidente cuando se trabaja con separaciones de UHPLC con frecuencias de adquisición insuficientes. Además, al aumentar la velocidad de adquisición se observa un aumento de la sensibilidad, debido a la mejor definición del pico. Así, si se considera que un pico está bien definido cuando está descrito como

mínimo con 10 puntos, se debe llegar a un compromiso entre el número de canales activos y la velocidad de adquisición para poder asegurar la correcta definición de los picos y para no perder ni sensibilidad ni resolución en las separaciones.

Se propone trabajar únicamente con 2 canales de detección, consiguiendo una velocidad de adquisición máxima de 2 puntos/s. De manera que suponiendo que la anchura del pico es de 0,1 min, correspondería a una definición de 12 puntos/pico. Así, para cubrir todas las longitudes de onda de trabajo será imprescindible programar ventanas de cambio de longitudes de onda y en el caso de que no sea posible incluirlas todas, se deberá realizar más de una inyección en métodos con diferentes longitudes de onda de adquisición.

Con la configuración de dos canales y cambios de ventanas de longitudes de onda, es posible obtener en una misma inyección los resultados de los HAPs prioritarios por la EPA y también del B_jF. En realidad, se detectan 16 picos porque el acenaftileno (como ya se ha comentado) no es fluorescente.

En la [Tabla 59], se presentan las ventanas de detección propuestas y los compuestos que se determinan en cada una de ellas

Tabla 59. Tabla de gradientes considerados en la columna Zorbax Eclipse PAH. Optimización

| Método | CANAL A | | CANAL B | |
|------------------|--------------------------------------------|------------|-------------|-----------------------------------------------------|
| | Condiciones | Compuestos | Condiciones | Compuestos |
| Ventana 1 | Inicio ventana (min) | 0 min | 0 min | Na, Ace, Flu |
| | $\lambda_{excitación} / \lambda_{emisión}$ | 250/376 | 280/340 | |
| Ventana 2 | Inicio ventana (min) | 2,80 min | 2,60 min | Flt |
| | $\lambda_{excitación} / \lambda_{emisión}$ | 333/390 | 285/450 | |
| Ventana 3 | Inicio ventana (min) | 3,65 min | 3,10 min | BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBaH _a , BghiP |
| | $\lambda_{excitación} / \lambda_{emisión}$ | 318/510 | 296/405 | |

En la [Figura 42], se presentan los cromatogramas obtenidos (canal A y canal B) al analizar un patrón de los 16 EPA-HAPs, incluyendo las ventanas de detección propuestas.

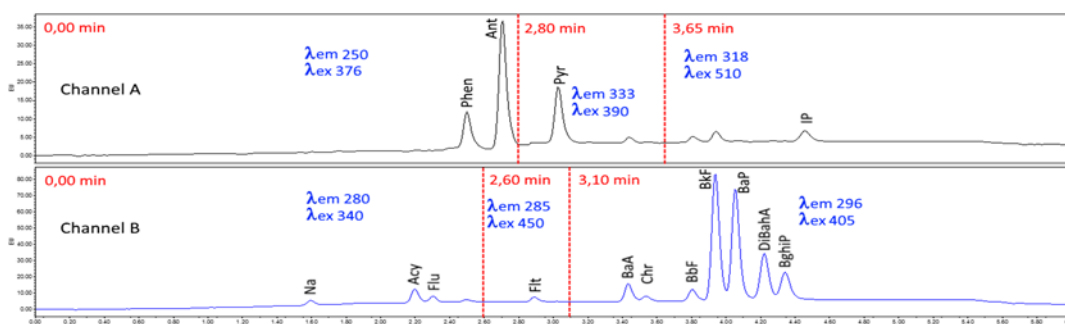


Figura 42. Ventanas de detección para la determinación de los 15 EPA-HAPs y B_jF por UHPLC-FLU. Análisis de un patrón de 400 ng/mL de los 16 EPA-HAPs.

4.4. MÉTODO CROMATOGRÁFICO OPTIMIZADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS 16+1 EPA-HAPs POR UHPLC-FLU.

En la [Tabla 60], se presentan las condiciones de separación definitivas para la determinación de los 16 EPA-HAPs y el B_jF por UHPLC-FLU.

Tabla 60. Condiciones cromatográficas definitivas para la separación de los 16 EPA-HAPs y B_jF por UHPLC-FLU.

| Método cromatográfico UHPLC-FLU. Separación 16 EPA-HAPs y B_jF | |
|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Columna | Zorbax Eclipse PAH RRHD (50 X 3,0 mm; 1,8 μm) |
| Volumen de inyección | 2 μL |
| Temperatura | 33°C |
| Flujo | 0,77 mL/min |
| Fase móvil | A: Agua MilliQ B: Metanol/acetoneitrilo (50:50) |
| Gradiente de elución | 0 min: 50% A / 50% B 1,85 min: 29% A / 71% B 3,64 - 5,00 min: 0% A / 100% B 5,25 – 6,00 min: 50% A / 50% B (estabilización condiciones iniciales) |
| Detección | FLU |
| Tiempo de cromatograma | 6 min |

En la [Tabla 61], se presentan los tiempos de retención de los 17 compuestos en el método cromatográfico puesto a punto por UHPLC-FLU. Además se incluyen, los tiempos de retención relativos al BaP además de las longitudes de onda de detección de cada uno de los compuestos junto con su canal de detección y la ventana (o grupo) en el que se detecta.

Tabla 61. Método cromatográfico UHPLC-FLU. Listado de los 16 EPA-HAPs y del B_jF. Se incluyen los tiempos de retención y los tiempos de retención relativos al BaP. También se incluye los canales de detección con las longitudes de onda (excitación/emisión) y la ventana de detección.

| Compuesto | Tiempo de retención (min) | trR (BaP) | CANAL A | | CANAL B | |
|----------------------|---------------------------|-----------|---------------------------------|---------|------------------------------|---------|
| | | | $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ | Ventana | $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ | Ventana |
| Naftaleno | 1,566 | 0,39 | --- | --- | 280/340 | Grupo 1 |
| Acenaftileno | 1,756 | 0,43 | No se detecta (no fluorescente) | | | |
| Acenafteno | 2,166 | 0,53 | --- | --- | 280/340 | Grupo 1 |
| Fluoreno | 2,273 | 0,56 | --- | --- | 280/340 | Grupo 1 |
| Fenantreno | 2,466 | 0,61 | 250/376 | Grupo 1 | --- | --- |
| Antraceno | 2,677 | 0,66 | 250/376 | Grupo 1 | --- | --- |
| Fluoranteno | 2,860 | 0,70 | --- | --- | 285/450 | Grupo 2 |
| Pireno | 3,000 | 0,74 | 333/390 | Grupo 2 | --- | --- |
| Benzo(a)antraceno | 3,414 | 0,84 | --- | --- | 296/405 | Grupo 3 |
| Criseno | 3,519 | 0,87 | --- | --- | 296/405 | Grupo 3 |
| Benzo(j)fluoranteno | 3,668 | 0,90 | 318/510 | Grupo 3 | --- | --- |
| Benzo(b)fluoranteno | 3,788 | 0,93 | --- | --- | 296/405 | Grupo 3 |
| Benzo(k)fluoranteno | 3,930 | 0,97 | --- | --- | 296/405 | Grupo 3 |
| Benzo(a)pireno | 4,059 | 1,00 | --- | --- | 296/405 | Grupo 3 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 4,253 | 1,05 | --- | --- | 296/405 | Grupo 3 |
| Benzo(ghi)perileno | 4,367 | 1,08 | --- | --- | 296/405 | Grupo 3 |
| Indeno(123-cd)pireno | 4,490 | 1,11 | 318/510 | Grupo 3 | --- | --- |

trR (BaP): tiempo de retención del compuesto "i" respecto al BaP

4.5. AMPLIACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO OPTIMIZADO POR UHPLC-FLU A LA DETERMINACIÓN DE LOS 24 HAPs A ESTUDIO (16+1 EPA-HAPs CON 15 SCF-HAPs).

Con la finalidad de poder determinar los 24 HAPs a estudio, es decir, los 16 EPA-HAPs con B₁F además, del ciclopenta(cd)pireno, metilcriseno, benzo(e)pireno y los cuatro isómeros del dibenzopireno (DiBa₁P, DiBa_eP; DiBa_iP y DiBa_hP), se decide inyectar 2 µL de un patrón conjunto preparado a partir de los patrones concentrados PAH MIX 9 y el PAH MIX 170, en la columna Zorbax Eclipse HAP utilizando, en este caso como fase móvil, agua MilliQ y acetonitrilo/metanol (50:50) a un flujo de 0,77 mL/min. Este patrón conjunto se inyecta utilizando un gradiente de elución ligeramente diferente al definitivo propuesto para el método optimizado por UHPLC-FLU pero permite conocer igualmente el orden de elución de los nuevos compuestos.

El patrón se prepara a una concentración de 500 ng/mL de los HAPs presentes en cada uno de las disoluciones conjuntas diluidas en acetonitrilo, de manera que la concentración de los compuestos que sólo están presentes en una de las disoluciones será de 500 ng/mL, mientras que los que están presentes en los dos patrones preparados serán del doble. Así, se puede decir que:

| | |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| HAPs comunes [PAH MIX 9 y PAH MIX 170]: | BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBa _h A, BghiP e IP. |
| Presentes en PAH MIX 9: | Na, Ace, Acy, Fl, Fe, An, Pa y Pyr. |
| Presentes en PAH MIX 170: | B ₁ F, CP(cd)P, 5MeCry y 4 isómeros DiBP. |

En la [Figura 43], se presenta el cromatograma obtenido al analizar en las condiciones propuestas el patrón conjunto de HAPs (incluye 23 HAPs a estudio). La detección en este caso se realiza con el detector de ultravioleta a 254 nm.

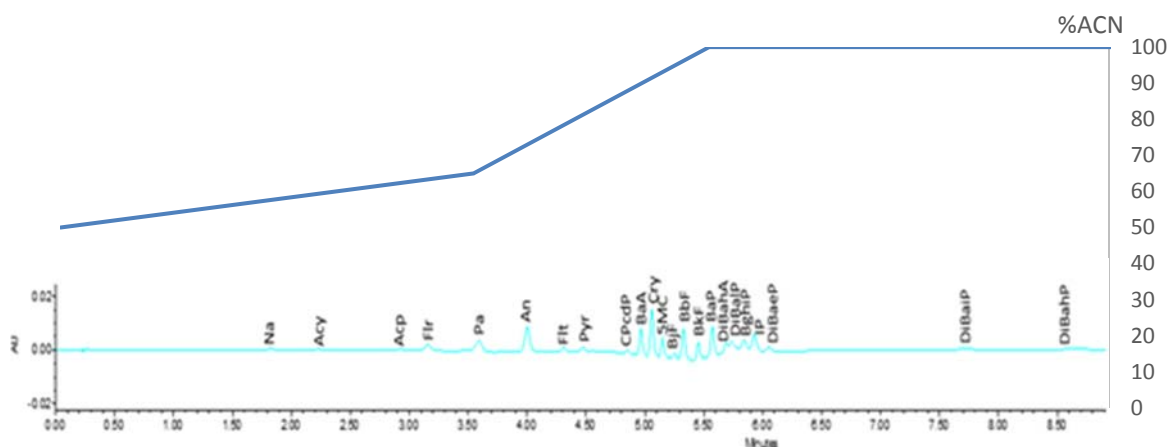


Figura 43. Presentación del orden de elución de 23 (no incluye BeP) de los 24 HAPs a estudio. Análisis por UHPLC-UV (254 nm) de un patrón conjunto de concentración: 1000 ng/mL (BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBa_hA, BghiP y IP); 500 ng/mL (resto de compuestos).

Como se puede observar, el orden de elución de todos los compuestos a estudio en la columna Zorbax Eclipse HAP es el mismo que se había obtenido en el método cromatográfico optimizado por HPLC en la columna Pursuit 3 HAP, demostrando que ambas columnas tienen fases

estacionarias equivalentes en lo que hace referencia a la selectividad para esta familia de compuestos.

Cabe destacar que en este caso no se ha inyectado el BeP, pero este eluye conjuntamente con el BbF, tal y como se había demostrado en los estudios realizados en la columna Pursuit 3 PAH en la optimización de la separación llevada a cabo para en el método cromatográfico presentado por HPLC.

Para intentar avanzar los dos últimos picos (DiBaIP y DiBaHP), se decide cambiar el componente orgánico de la fase móvil utilizando isopropanol en lugar de metanol, manteniendo la proporción en la mezcla con el acetonitrilo (50:50). De esta manera, se puede conseguir avanzar los picos más retenidos aprovechando el mayor poder eluotrópico que tiene este disolvente frente a los otros dos modificadores orgánicos utilizados (metanol y acetonitrilo). Por el contrario, el problema que presenta trabajar con isopropanol, es que hace aumentar mucho la presión de trabajo. Esto es un problema en HPLC convencional, ya que ni sistema ni columna podrían soportar las presiones necesarias para trabajar con esta proporción de isopropanol, obligando a disminuir mucho el flujo de trabajo. En cambio, en sistemas y columnas de UHPLC, que son capaces de trabajar a altas presiones el uso de isopropanol en la fase móvil para aumentar su poder eluotrópico puede ser una buena alternativa.

Sin embargo, los resultados obtenidos no han sido satisfactorios ya que se ha modificado demasiado la selectividad de la fase móvil. Realmente se consigue avanzar dos minutos los últimos picos. Sin embargo, la anchura de estos picos no mejora sustancialmente, y además, se pierde parte de la selectividad que se tenía cuando se trabaja con ACN/MeOH como modificador orgánico de la fase móvil. Al trabajar con isopropanol, se solapan picos como el 5-metilcriseno y el benzo(j)fluoranteno y se pierde totalmente la resolución de los picos DiBaHA, DiBaIP, BghiP e IP.

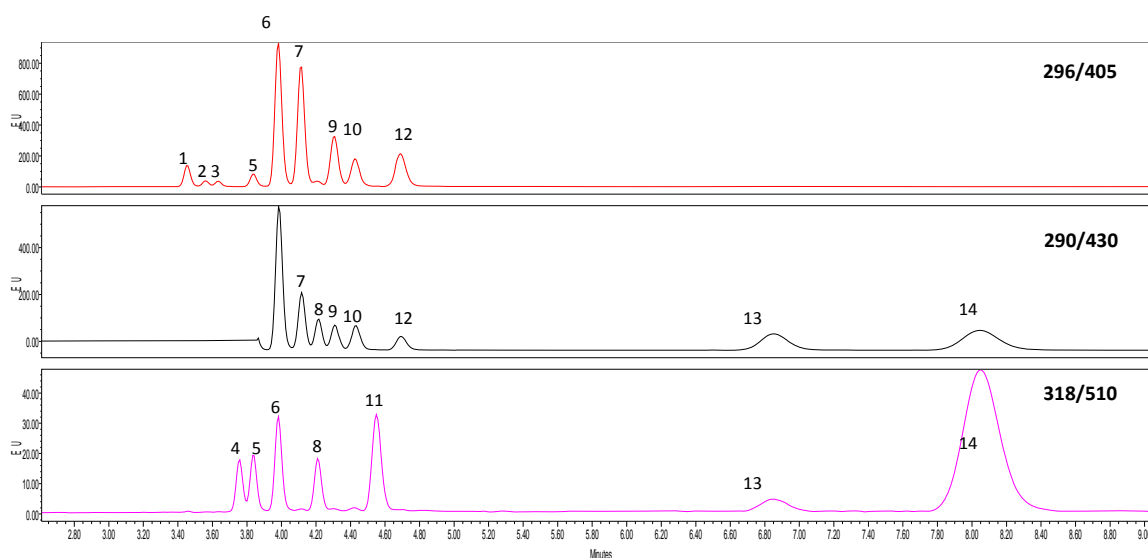
Así, se inyecta un patrón conjunto preparado a partir del PAH MIX 170, que incluye los 15 HAPs propuestos por la SCF (BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBaHA, BghiP e IP además de BbF, CP(cd)P, 5MeCry y 4 isómeros DiBP) en las condiciones cromatográficas correspondientes al método definitivo optimizado para los 16+1 EPA-HAPs por UHPLC [Tabla 60] pero alargando el tiempo en que el gradiente está en la máxima proporción de modificador orgánico acabando a los 8,5 min en lugar de a los 5 min. En este caso, la detección ya se realiza con el detector de fluorescencia.

Para no perder sensibilidad y definición de los picos se realizan dos inyecciones. En la [Tabla 62] se presentan las condiciones de detección propuestas para la detección FLU de los 15 SCF-HAPs. Aunque se debe destacar que no aparece el ciclopenta(cd)pireno porque no es fluorescente.

Tabla 62. Condiciones de detección de fluorescencia para la determinación de los 15 SCF-HAPs. Se presentan dos parejas de longitudes de onda por compuesto (correspondientes a las parejas de longitudes de onda principales (mayora señal) y secundarias (corroboración de la presencia del pico)).

| CANAL | $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ | Compuestos [Pareja λ principales] | Compuestos [Pareja λ secundarias] |
|-------------------|------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| A | 296/405 | BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP | 5MC, DiBaeP |
| B | 318/510 | BjF, IP | DiBaIP, DiBaiP, DiBahP |
| A (grupo 1) | 265/380 | 5MC | BaA, Cry |
| A (grupo 2) | 290/430 | DiBaIP, DiBaeP, DiBaiP, DiBahP | BbF, BkF, BaP |
| B (repetibilidad) | 296/405 | BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP | 5MC, DiBaeP |

En la [Figura 44], se presentan los cromatogramas obtenidos al analizar en las condiciones UHPLC-FLU.



Identificación: (1) BaA (2) Cry (3) 5MC (4) BjF (5) BbF (6) BkF (7) BaP (8) DiBaIP (9) DiBahA (10) BghiP (11) IP (12) DiBaeP (13) DiBaiP (14) DiBahP

Figura 44. Método UHPLC-FLU para la determinación de los 15 SCF-HAPs. Cromatogramas correspondientes a un patrón conjunto de 125 ng/mL preparado en acetonitrilo. Se incluyen los cromatogramas correspondientes a dos inyecciones: 1ª inyección (Canal A (296/405) y B (318/510)); 2ª inyección (Canal A (sólo 290/430))

En la [Tabla 63], se presentan las condiciones de separación para la determinación de los 24 HAPs a estudio. Incluyen los 16 EPA-HAPs y los 15 SCF-HAPs por UHPLC-FLU.

Tabla 63. Condiciones cromatográficas definitivas para la separación de los 16 EPA-HAPs y los 15 SCF-HAPs por UHPLC-FLU.

| Método cromatográfico UHPLC-FLU. Separación 24 HAPs (16 EPA-HAPs y 15 SCF-HAPs) | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Columna | Zorbax Eclipse PAH RRHD (50 X 3,0 mm; 1,8 µm) |
| Volumen de inyección | 2 µL |
| Temperatura | 33°C |
| Flujo | 0,77 mL/min |
| Fase móvil | A: Agua MilliQ B: Metanol/acetoneitrilo (50:50) |
| Gradiente de elución | 0 min: 50% A / 50% B 1,85 min: 29% A / 71% B 3,64 - 8,50 min: 0% A / 100% B 8,55 – 9,50 min: 50% A / 50% B (estabilización condiciones iniciales) |
| Detección | FLU |
| Tiempo de cromatograma | 9,5 min |

En la [Tabla 64], se presentan los tiempos de retención de los 17 compuestos en el método cromatográfico puesto a punto por UHPLC-FLU. Además se incluyen, los tiempos de retención relativos al BaP además de las longitudes de onda de detección de cada uno de los compuestos junto con su canal de detección y la ventana o grupo dentro del que se detecta.

Tabla 64. Método cromatográfico definitivo de UHPLC-FLU para la separación de los 24 HAPs a estudio. Listado de los 15 SCF-HAPs. Se incluyen los tiempos de retención y los tiempos de retención relativos al BaP. También se incluye los canales de detección con las longitudes de onda (excitación/emisión) y la ventana de detección.

| Compuesto | Tiempo de retención (min) | trR (BaP) | CANAL A | | CANAL B | |
|-----------------------------|---------------------------|-------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|----------------|
| | | | $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ | Ventana | $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ | Ventana |
| Ciclopenta(cd)pireno | 3,369 | 0,83 | Compuestos no fluorescente | | | |
| Benzo(a)antraceno | 3,414 | 0,84 | --- | --- | 296/405 | Grupo 3 |
| Criseno | 3,519 | 0,87 | --- | --- | 296/405 | Grupo 3 |
| 5-metilcriseno | 3,613 | 0,89 | | | 296/405 | Grupo 3 |
| Benzo(j)fluoranteno | 3,668 | 0,90 | 318/510 | Grupo 3 | --- | --- |
| Benzo(b)fluoranteno | 3,788 | 0,93 | --- | --- | 296/405 | Grupo 3 |
| Benzo(k)fluoranteno | 3,930 | 0,97 | --- | --- | 296/405 | Grupo 3 |
| Benzo(a)pireno | 4,059 | 1,00 | --- | --- | 296/405 | Grupo 3 |
| Dibenzo(al)pireno | 4,140 | 1,02 | 290/430 | Grupo 2 (2^oiny) | --- | --- |
| Dibenzo(ah)antraceno | 4,253 | 1,05 | | | 296/405 | Grupo 3 |
| Benzo(ghi)perileno | 4,367 | 1,08 | --- | --- | 296/405 | Grupo 3 |
| Indeno(123-cd)pireno | 4,490 | 1,11 | 318/510 | Grupo 3 | --- | --- |
| Dibenzo(ae)pireno | 4,587 | 1,13 | 290/430 | Grupo 2 (2^oiny) | --- | --- |
| Dibenzo(ai)pireno | 6,657 | 1,64 | 290/430 | Grupo 2 (2^oiny) | --- | --- |
| Dibenzo(ah)pireno | 7,834 | 1,93 | 290/430 | Grupo 2 (2^oiny) | --- | --- |

trR (BaP): tiempo de retención del compuesto "i" respecto al BaP. En negrita se marcan los compuestos que no aparecían en la lista de los 16+1 EPA-HAPs.

4.6. ESTUDIO DE PARÁMETROS DE LA RESPUESTA EN EL SISTEMA DE UHPLC-FLU: LINEALIDAD Y LOD/LOQ. MÉTODO CROMATOGRÁFICO GLOBAL.

Una vez definido el método cromatográfico para la determinación de los HAPs por UHPLC-FLU, se decide estudiar la linealidad y los límites de detección y cuantificación, igual que se ha hecho con los otros dos métodos cromatográficos puestos a punto tanto por HPLC-FLU como por HRGC-MS (EI/SIM). Estos parámetros se han valorado con patrones.

En este caso, la linealidad no se determina para todos los HAPs sino para los compuestos más pesados, a partir del benzo(a)antraceno. Así, para los HAP8 (BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP e IP) se estudia la linealidad de la respuesta en un margen de concentraciones de 0,1 a 1000 ng/mL, es decir, el rango inferior se inicia un orden de magnitud inferior que lo que se había hecho en las otras dos técnicas utilizadas. Esto se realiza para poder aplicarlo en la determinación de los HAPs en muestras alimentarias, donde el nivel de concentración en la muestras es muy bajo, llegando hasta 0,01 µg/kg. Para los otros HAPs pesados (5-metilcriseno, benzo(j)fluoranteno y los cuatro isómeros del dibenzopireno) el margen de concentraciones estudiado es de 5 a 500 mg/L. Los únicos compuestos que no se incluyen en este estudio son los dos compuestos no fluorescente (acenaftileno y ciclopenta(cd)pireno) y el benzo(e)pireno, por solaparse parcialmente con el pico del BbF.

Como para los HAP8, el rango de estudio es demasiado amplio, se considera la posibilidad de evaluar la linealidad en dos rangos según sean las concentraciones bajas o altas, mientras que para los otros compuestos el rango es único. El margen de concentraciones que engloba cada rango se incluye a continuación:

HAP8 (disoluciones preparadas a partir del patrón conjunto comercial concentrado PAH MIX9 (100 mg/L) por dilución en acetonitrilo, que incluye los 16 EPA-HAPs):

Linealidad a concentraciones altas: incluye cinco patrones comprendidos entre 10 y 1000 ng/mL de concentraciones individuales: 10, 50, 100, 250, 500 y 1000 ng/mL.

Linealidad a concentraciones bajas: incluye cuatro patrones comprendidos entre 0,1 y 10 ng/mL, de concentraciones individuales: 0,1, 1, 5 y 10 ng/mL.

Para los otros seis HAPs pesados: 5-metilcriseno, benzo(j)fluoranteno y los cuatro isómeros del dibenzopireno (disoluciones preparadas a partir del patrón conjunto comercial concentrado PAH MIX 170 (10 mg/L) por dilución en acetonitrilo):

Linealidad única (concentraciones altas): incluye cinco patrones comprendidos entre 5 y 500 ng/mL, de concentraciones individuales: 5, 10, 100, 250 y 500 ng/mL.

En todos los casos, los patrones se inyectan por duplicado en el método definitivo optimizado por UHPLC-FLU [Tabla 63] y se valoran con las parejas de longitud de onda principales.

4.6.1. Estudio de linealidad.

La linealidad se evaluará desde dos puntos de vista:

- *Ajuste por mínimos cuadrados.* Se incluyen las rectas de regresión para cada uno de los analitos en los diferentes márgenes propuestos. Para criticar el modelo del ajuste, se calculan los coeficientes de determinación (R^2). Además, se critican los parámetros de las rectas de regresión, la pendiente y la ordenada en el origen, a partir del estudio de sus intervalos de confianza (calculados a partir del test de *Student*).
- *Coefficiente de variación de los factores de respuesta.* Con ello se valora la proporcionalidad de la respuesta en cada uno de los rangos de trabajo propuestos. Se considera tanto el promedio de los factores de respuesta como el coeficiente de variación.

En la [Tabla 65] y la [Tabla 71], se presentan los resultados del ajuste por mínimos cuadrados tanto de los HAP8 como de los otros 6 HAPs pesados a estudio, teniendo en cuenta los rangos de concentraciones altas: (1) de 10 a 1000 ng/mL y (2) de 5 a 500 ng/mL. Mientras que en la [Tabla 65], se presentan los resultados del ajuste por mínimos cuadrados (sólo para los 16 EPA-HAPs) pero en el rango de concentraciones de 0,1 a 10 ng/mL (linealidad a concentraciones bajas).

Tabla 65. Resultados del ajuste por mínimos cuadrados para los HAPs en un rango de concentraciones altas: (1) de 10 a 1000 ng/mL (2) de 5 a 500 ng/mL. Se incluyen el rango de estudio, así como los coeficientes de determinación (R^2) y los intervalos de confianza (IC) de los parámetros de la recta, pendiente y ordenada en el origen.

| Compuesto | Rango | Recta regresión | | Crítica modelo R^2 | Valoración parámetros recta | | | |
|----------------------|-------|------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------------------|--------------------|---------------------|---|
| | | Pendiente (área/ng/mL) | Ordenada (área) | | IC pendiente | IC ordenada origen | | |
| Benzo(a)antraceno | (1) | 50292 | 41053 | 0,999993 | [50110, 50475] | √ | [-44720, 126825] | √ |
| Criseno | (1) | 12538 | 21573 | 0,999942 | [12406, 12671] | √ | [-40649, 83794] | √ |
| 5-metilcriseno | (2) | 9128 | 79156 | 0,991 | [7897, 10360] | √ | [-207596, 365908] | √ |
| Benzo(j)fluoranteno | (2) | 4527 | 34379 | 0,993 | [4016, 5039] | √ | [-84621, 153378] | √ |
| Benzo(b)fluoranteno | (1) | 28336 | 68629 | 0,999970 | [28121, 28551] | √ | [-32377, 169635] | √ |
| Benzo(k)fluoranteno | (1) | 322129 | 163907 | 0,999983 | [319684, 324573] | √ | [-459451, 787266] | √ |
| Benzo(a)pireno | (1) | 296853 | 272894 | 0,999959 | [293376, 300330] | √ | [-613648, 1159436] | √ |
| Dibenzo(ah)antraceno | (1) | 132888 | 421518 | 0,999931 | [131357, 134420] | √ | [-298225, 1141261] | √ |
| Dibenzo(al)pireno | (2) | 4713 | 38427 | 0,994 | [4197, 5228] | √ | [-81501, 158355] | √ |
| Benzo(ghi)perileno | (1) | 82886 | 152752 | 0,999966 | [82216, 83556] | √ | [-162040, 467543] | √ |
| Indeno(123-cd)pireno | (1) | 14576 | 1976 | 0,999997 | [14539, 14613] | √ | [-15307, 19259] | √ |
| Dibenzo(ae)pireno | (2) | 89740 | 647472 | 0,995 | [80494, 98986] | √ | [-1504918, 2799861] | √ |
| Dibenzo(ai)pireno | (2) | 4394 | 40592 | 0,992 | [3227, 5562] | √ | [-292123, 373307] | √ |
| Dibenzo(ah)pireno | (2) | 72937 | 366820 | 0,994 | [65398, 80475] | √ | [-1388043, 2121682] | √ |

IC: intervalo de confianza calculado a partir del test de Student con un grado de confianza del 95%.

Tabla 66. Resultados del ajuste por mínimos cuadrados para los HAP8 en un rango de concentraciones bajas: (1) 0,1 a 10 ng/mL (2) 1 a 10 ng/mL. Se incluyen el rango de estudio, así como los coeficientes de determinación (R²) y los intervalos de confianza (IC) de los parámetros de la recta, pendiente y ordenada en el origen.

| Compuesto | Rango | Recta regresión | | Crítica modelo R ² | Valoración parámetros recta | | | |
|----------------------|-------|------------------------|-----------------|----------------------------------|-----------------------------|--------------------|------------------|---|
| | | Pendiente (área/ng/mL) | Ordenada (área) | | IC pendiente | IC ordenada origen | | |
| Benzo(a)antraceno | (2) | 48810 | -5986 | 0,999788 | [39770, 57850] | √ | [-64574, 52602] | √ |
| Criseno | (2) | 11390 | 1471 | 0,999979 | [10734, 12046] | √ | [-2781, 5723] | √ |
| Benzo(b)fluoranteno | (2) | 29990 | 2833 | 0,999987 | [28602, 31378] | √ | [-6162, 11827] | √ |
| Benzo(k)fluoranteno | (1) | 311744 | 16437 | 0,999991 | [308715, 316151] | √ | [-9896, 31844] | √ |
| Benzo(a)pireno | (1) | 292724 | 42804 | 0,999919 | [284730, 300718] | √ | [-2065, 87672] | √ |
| Dibenzo(ah)antraceno | (2) | 133303 | 13151 | 0,999886 | [117063, 148092] | √ | [-81652, 119440] | √ |
| Benzo(ghi)perileno | (2) | 84897 | 26738 | 0,999782 | [68951, 100844] | √ | [-76605, 130082] | √ |
| Indeno(123-cd)pireno | (2) | 13619 | -4162 | 0,989803 | [7529, 19155] | √ | [-37857, 37492] | √ |

IC: intervalo de confianza calculado a partir del test de Student con un grado de confianza del 95%.

Según el ajuste por mínimos cuadrados, se observa que para todos los HAPs pesados (a partir del BaA), los coeficientes de determinación (R²) son superiores o iguales a 0,99, tanto en el rango de concentraciones altas como en el rango de concentraciones bajas. Además, en todos los casos se cumple la significación estadística tanto de la pendiente como de la ordenada en el origen. Los intervalos de confianza (calculados con un grado de significación del 95%), en el caso de la pendiente no incluyen el cero, mientras que en el caso de la ordenada en el origen sí se incluyen.

En la [Tabla 67] y la [Tabla 68], se incluyen los factores de respuesta para cada uno de los analitos estudiados, calculados como la relación entre la concentración y el área de cada uno de los patrones y su coeficiente de variación en el rango de concentraciones a estudio. En este caso, también se incluyen los resultados en los diferentes rangos de concentraciones presentados. Es importante destacar, que en el rango de concentraciones bajas sólo se incluyen los resultados correspondientes al rango de 1 a 10 ng/mL, ya que los coeficientes de variación considerando el patrón de 0,1 ng/mL aumentan mucho.

Tabla 67. Factores de respuesta y coeficientes de variación para los HAPs pesados en los rangos de concentración: (1) 10 a 1000 ng/mL (2) 5 a 500 ng/mL.

| Compuesto | Rango | Factores de respuesta | |
|----------------------|-------|----------------------------|-----------------|
| | | Fr promedio [(ng/mL)/área] | Ordenada (área) |
| Benzo(a)antraceno | (1) | 1,98E-05 | 0,82 |
| Criseno | (1) | 8,03E-05 | 4,0 |
| 5-metilcriseno | (2) | 1,01E-04 | 6,5 |
| Benzo(j)fluoranteno | (2) | 2,05E-04 | 5,5 |
| Benzo(b)fluoranteno | (1) | 3,44E-05 | 3,1 |
| Benzo(k)fluoranteno | (1) | 3,09E-06 | 0,32 |
| Benzo(a)pireno | (1) | 3,33E-06 | 1,1 |
| Dibenzo(ah)antraceno | (1) | 7,34E-06 | 1,9 |
| Dibenzo(al)pireno | (2) | 1,85E-04 | 4,6 |
| Benzo(ghi)perileno | (1) | 1,19E-05 | 1,4 |
| Indeno(123-cd)pireno | (1) | 6,87E-05 | 0,6 |
| Dibenzo(ae)pireno | (2) | 1,02E-05 | 2,1 |
| Dibenzo(ai)pireno | (2) | 2,20E-04 | 5,0 |
| Dibenzo(ah)pireno | (2) | 1,33E-05 | 5,8 |

Rango (1): de 10 a 1000 ng/mL; Rango (2): de 5 a 500 ng/mL.

Tabla 68. Factores de respuesta y coeficientes de variación para los HAP8 en el rango de concentraciones bajas de 1 a 10 ng/mL.

| Compuesto | Factores de respuesta | |
|----------------------|----------------------------|-----------------|
| | Fr promedio [(ng/mL)/área] | Ordenada (área) |
| Benzo(a)antraceno | 2,14E-05 | 3,8 |
| Criseno | 8,31E-05 | 6,6 |
| Benzo(b)fluoranteno | 3,21E-05 | 3,8 |
| Benzo(k)fluoranteno | 3,13E-06 | 3,0 |
| Benzo(a)pireno | 3,18E-06 | 8,8 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 7,16E-06 | 5,0 |
| Benzo(ghi)perileno | 1,05E-05 | 10,9 |
| Indeno(123-cd)pireno | 7,88E-05 | 10,2 |

En lo que hace referencia a la proporcionalidad de la respuesta con el estudio de los coeficientes de variación de los factores de respuesta, se observa que en el rango de concentraciones altas, los coeficientes de variación para los HAP8 son inferiores al 5%, mientras que para los otros HAPs pesados se puede decir que son inferiores al 7%. En cambio, en el rango de concentraciones bajas, descartando el patrón de concentración más baja (0,1 ng/mL), los coeficientes de variación son inferiores al 11%.

A raíz de los resultados obtenidos, se puede concluir que:

- Para todos los HAPs pesados (HAP8, 5-metilcriseno, benzo(j)fluoranteno y los cuatro isómeros del dibenzopireno) se puede definir un rango de concentraciones altas comprendido entre 10 y 1000 ng/mL (HAP8) y entre 5 y 500 ng/mL (para los otros HAPs pesados).
- Además, para los HAP8 se puede definir un rango lineal de concentraciones de trabajo comprendido entre 1 ng/mL y 10 ng/mL.

Así que es posible determinar concentraciones de hasta 1 ng/mL para los HAP8. Esta concentración 10 veces inferior a la que se puede determinar por HPLC-FLU o por HRGC-MS (IE/SIM), permitirá trabajar con muestras alimentarias donde los niveles de concentración en las muestras son del orden de los 10 ng/kg.

4.6.2. Estudio de las concentraciones límite (LOD/LOQ).

Como segundo de los parámetros de calidad estudiados con patrones se estudian los límites de detección y cuantificación del método cromatográfico puesto a punto por UHPLC-FLU. En este caso, también se valoran las concentraciones límites de los HAPs más pesados (HAP8, 5-metilcriseno, benzo(j)fluoranteno y los cuatro isómeros del dibenzopireno). El cálculo del LOD y el LOQ, se efectúa igual que se ha realizado en los otros dos métodos cromatográficos puestos a punto. Se calculan de forma teórica a partir del estudio de la relación señal/ruido del patrón de concentración más baja de la recta de calibrado, siguiendo la [Ecuación 2].

En la [Tabla 69], se presentan las concentraciones límite (LOD/LOQ) para cada uno de los HAPs a estudio correspondientes al método cromatográfico puesto a punto por UHPLC-FLU.

Tabla 69. Concentraciones límite (LOD/LOQ) para los HAPs pesados en el método cromatográfico puesto a punto por UHPLC-FLU. Naranja: LOQ>5 ng/mL; Gris: 5< LOQ<1 ng/mL; Negro: LOQ≤ 1 ng/mL.

| Compuesto | Concentración patrón referencia (ng/mL) | Señal/Ruido | LOD (ng/mL) | LOQ (ng/mL) |
|----------------------|-----------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Benzo(a)antraceno | 1,0 | 24 | 0,13 | 0,42 |
| Criseno | 1,0 | 7 | 0,43 | 1,4 |
| 5-metilcriseno | 5,0 | 11 | 1,4 | 4,6 |
| Benzo(j)fluoranteno | 5,0 | 3 | 5,0 | 17 |
| Benzo(b)fluoranteno | 1,0 | 13 | 0,23 | 0,77 |
| Benzo(k)fluoranteno | 1,0 | 155 | 0,02 | 0,06 |
| Benzo(a)pireno | 1,0 | 149 | 0,02 | 0,07 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 1,0 | 61 | 0,05 | 0,16 |
| Dibenzo(al)pireno | 5,0 | 3 | 5,0 | 17 |
| Benzo(ghi)perileno | 1,0 | 42 | 0,07 | 0,24 |
| Indeno(123-cd)pireno | 1,0 | 13 | 0,23 | 0,77 |
| Dibenzo(ae)pireno | 5,0 | 75 | 0,20 | 0,67 |
| Dibenzo(ai)pireno | 5,0 | 8 | 1,9 | 6,3 |
| Dibenzo(ah)pireno | 5,0 | 8 | 1,9 | 6,3 |

Como se puede observar, para todos los HAPs los LOQ son inferiores a 1 ng/mL a excepción de para el criseno, que es el que tiene menos señal, que es igual a 1 ng/mL. Por lo que se puede llegar a cuantificar a esta concentración, 10 veces inferior para todos estos compuestos, que lo que se podía realizar por HPLC-FLU convencional o por HRGC. Sólo en el caso de los dibenzopirenos las concentraciones límites son superiores y cercanas a las obtenidas por HRGC-MS.

4.7. COMPARATIVA DE MÉTODOS: HPLC-FLU vs. UHPLC-FLU.

Si se comparan los dos métodos cromatográficos puestos a punto para la separación de los 24 HAPs (16 EPA-HAPs con benzo(j)fluoranteno, 5-metilcriseno, ciclopenta(cd)pireno benzo(e)pireno y los cuatro isómeros del dibenzopireno) tanto por cromatografía líquida convencional (HPLC) como por UHPLC:

- **Separación:** En los dos casos, es posible la separación de 23 de los 24 HAPs a estudio, ya que el BeP se solapa parcialmente con el BbF. Sin embargo, como en ambos casos se trabaja con un detector de fluorescencia es posible cuantificar ambos compuestos seleccionando la pareja de longitudes de onda adecuada en cada caso. Como punto negativo de trabajar con el detector de fluorescencia, es que no es posible detectar ni el acenaftileno ni el ciclopenta(cd)pireno porque no son fluorescentes.
- **Orden de elución:** El orden de elución de los HAPs en las dos columnas de cromatografía líquida utilizadas es el mismo. Esto indica que las fases estacionarias tanto de la columna Pursuit 3 PAH (100 X 4,6 mm; 3 µm) como de la Zorbax Eclipse HAP (50 X 3,0 mm; 1,8 µm), son equivalentes. Realmente el único compuesto que cambia su orden de elución

es el DiBaIP que en la columna Pursuit se eluye después del pico de DiBaHA, mientras que en la columna Zorbax se eluye justo antes de este compuesto.

- **Tiempo de cromatograma:** el último de los 16 EPA-HAPs (IP) se eluye con un tiempo de retención de 11 min por HPLC mientras que por UHPLC se eluye en tan sólo en 4,5 min. Así, se ha conseguido disminuir en más de la mitad el tiempo de cromatograma. Además, al trabajar con un sistema de UHPLC, se disminuye tanto el tiempo de estabilización en condiciones iniciales como el ciclo de inyección disminuyendo hasta en un 60% el tiempo total del cromatograma.
- **Sensibilidad:** Al trabajar con sistemas UHPLC se consigue disminuir 10 veces la concentración límite de trabajo y, así en lugar de fijar como el rango inferior de trabajo en 10 ng/mL en UHPLC se puede trabajar con una concentración de 1 ng/mL.
- **Precauciones de uso:** El principal inconveniente de trabajar con la técnica de UHPLC es que se deben tomar precauciones especialmente con los disolventes utilizados. Éstos deben ser específicos para trabajar con este tipo de sistemas y columnas ya que si no se acortan muchísimo el tiempo de vida de las columnas de tamaño de partícula pequeño. Además, se prefiere trabajar siempre con filtros pre-columnas, para evitar obturaciones que también acorten la vida de la columna.

***CAPITULO II.**
APLICACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS QSRR
AL ANÁLISIS DE HAPs

1. INTRODUCCIÓN A LAS METODOLOGIAS QSRR. INTERÉS DE APLICACIÓN.

Las **metodologías cuantitativas de relación estructura-retención (QSRR¹⁵)**, son una herramienta que estudia la retención de los analitos mediante las propiedades fisicoquímicas derivadas de su estructura química, conjuntamente con el efecto tanto de la fase estacionaria como de la fase móvil, en una separación cromatográfica.

Con la finalidad de desarrollar las metodologías QSRR es indispensable poder describir tanto la información química de las moléculas como del sistema cromatográfico (fase móvil-fase estacionaria). Los encargados, en este caso, son los **descriptores moleculares**, los cuales representan matemáticamente una propiedad y traducen su significado químico en un valor numérico tratable informáticamente. (Tejedor-Estrada, 2011) (Todeschini & Consonni, 2008)

Los descriptores se pueden clasificar:

- **2D**: sólo consideran el tipo de átomos que constituyen las moléculas y las conexiones que existen entre ellos, obviando su conformación. En ocasiones, los descriptores 2D se subdividen en diferentes categorías según la propiedad a la que hacen referencia, como son: propiedades de medida y forma, electrostáticas o derivadas de la matriz de adyacencia. (Cirera i Domenech, 2013)
- **3D**: esta categoría engloba los descriptores que proporcionan información tridimensional de la molécula, es decir, que dependen de su conformación.

A partir de los datos experimentales de retención cromatográfica de un conjunto de moléculas conocidas, denominadas **conjunto de entrenamiento**, y un grupo de descriptores, las metodologías QSRR permiten desarrollar los llamados **modelos de predicción**. Estos modelos definen la relación entre los descriptores para predecir un determinado parámetro cromatográfico. Esta relación se puede determinar de diferentes maneras, pero en la presente tesis se considerará, fundamentalmente, el análisis de regresión lineal, empleando el método de los mínimos cuadrados (*Partial Least Squares*, PLS). Así, el modelo de predicción describe el parámetro de retención cromatográfico (p.ej. tiempo de retención (t_r) o $\log k'$) como una combinación lineal de los descriptores escogidos (D) [Ecuación 9].

$$\log k' = a_0 + a_1 \cdot D_1 + a_2 \cdot D_2 + \dots + a_n \cdot D_n$$

Ecuación 9. Modelo de predicción, expresado como combinación lineal de descriptores.

La capacidad predictiva del modelo escogido debe estar validada. Dicha validación se puede realizar de dos maneras:

¹⁵ QSRR: *Quantitative Structure-Chromatographic Retention Relationships*.

- **LOO**, *Leave-One Out cross-validation*. Esta forma de validar el modelo consiste en dejar fuera una de las moléculas del conjunto de entrenamiento, de manera sucesiva. De manera que se tiene el error asociado a cada una de las moléculas utilizadas para establecer el modelo.
- **SS**, *Split Sample Validation*. Este sistema de validación utiliza un conjunto de moléculas conocidas de la misma familia pero diferentes a las del conjunto de entrenamiento, denominadas conjunto de prueba. Sobre este conjunto de moléculas se les aplica el modelo de predicción y se determina el parámetro de retención cromatográfico que se compara con el valor experimental.

Cuando los métodos QSRR se definen como combinación lineal de descriptores y éstos están relacionados con unas determinadas propiedades fisicoquímicas, se convierten en herramientas de elevado interés, tanto teórico como experimental, en el estudio de cualquier separación cromatográfica, ya que permiten:

- Conocer el mecanismo de separación que gobierna el sistema cromatográfico.
- Identificar aquellos descriptores estructurales con mayor significación en las interacciones entre analito y sistema cromatográfico (fase móvil-fase estacionaria) y comparar.
- Predecir el tiempo de retención de analitos de estructura química conocida pertenecientes a la misma familia de compuestos.
- Conocer o predecir posibles co-eluciones de analitos e interferencias de la muestra.

Debido al gran número de compuestos que forman parte de la familia de los HAPs, se ha considerado interesante la aplicación de las metodologías QSRR con la finalidad no sólo de conocer mejor los mecanismos que rigen la separación cromatográfica de este tipo de compuestos sino, especialmente para poder predecir los tiempos de retención de compuestos de la misma familia pero que no han sido estudiados cromatográficamente en la presente tesis.

Cabe destacar que la relación estructura-retención ha sido una línea de investigación histórica en la Sección de Cromatografía del IQS que se ha recuperado con la aplicación al análisis de aldehídos y cetonas (Cirera i Domenech, 2013), y que se quiere ampliar con la aplicación a la familia de los HAPs, familia de compuestos en los que se centra la presente tesis.

Así, se pretende establecer un modelo de predicción que sea capaz de describir la separación de los 16 EPA-HAPs además del B_jF por HPLC, puesto a punto en el primer capítulo de esta tesis. Así, para la separación se utiliza la columna Pursuit 3 PAH (10 X 4,6 mm; 3 µm) utilizando como fase móvil agua MilliQ y acetonitrilo en modo gradiente. Se trabajará con un detector de ultravioleta en lugar de con el detector de fluorescencia para poder detectar todos los compuestos a estudio, incluido el acenaftileno. Cabe destacar que en este capítulo se estudia simplemente el mecanismo de separación y es independiente del sistema de detección.

Además de establecer el modelo de predicción, se pretende estudiar la robustez del modelo si se modifica:

- El gradiente de elución.
- Las dimensiones de la columna y para ello se trabaja con una columna de UHPLC (método 3: UHPLC-FLU, optimizado en el Capítulo I de la presente tesis)
- El sistema cromatográfico y con este fin se utiliza la cromatografía de gases como mecanismo de separación, es decir, se trabaja con el método optimizado por HRGC (método 2: HRGC-MS, presentado en el Capítulo I de la presente tesis).
- La familia de compuestos y se aplica a una familia de compuestos derivados de los HAPs, los nitro-HAPs (hidrocarburos aromáticos policíclicos con un grupo nitro en su estructura).

2. SISTEMA CROMATOGRÁFICO DE PARTIDA. ANÁLISIS POR HPLC.

2.1. PARÁMETRO CROMATOGRÁFICO: COEFICIENTE DE RETENCIÓN

El primer punto a considerar, es escoger el parámetro cromatográfico sobre el cual se desarrollará el modelo QSRR. La primera duda que se plantea es, si las correlaciones se pueden establecer directamente sobre el tiempo de retención experimental (t_r), o bien, es conveniente utilizar otro parámetro como el coeficiente de retención ($\log k'$), que se puede calcular según la [Ecuación 10], donde t_M es el tiempo muerto o básico del sistema. (Harris, 2007)

$$\log k' = \log \left[\frac{t_R - t_M}{t_M} \right]$$

Ecuación 10. Fórmula del coeficiente de retención ($\log k'$) donde t_r es el tiempo de retención del compuesto y t_M el tiempo muerto del sistema.

El coeficiente de retención se define como el logaritmo del cociente entre el tiempo que requiere el analito para recorrer la columna cromatográfica y el tiempo muerto del sistema. Por lo tanto, como este parámetro tiene en cuenta el reparto del analito entre la fase estacionaria y la fase móvil se escoge como parámetro cromatográfico para definir el modelo de predicción. Además, como trabaja en escala logarítmica, permite normalizar los valores de tiempo de retención.

Pero para poder trabajar con este parámetro es fundamental determinar el tiempo muerto del sistema cromatográfico además de conocer el tiempo de retención de los analitos a estudio.

2.2. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO MUERTO.

El tiempo muerto o básico de un sistema cromatográfico se define como el tiempo de elución de un compuesto no retenido. (Harris, 2007)

Entre las diferentes formas utilizadas para su determinación, en este caso se considera:

- El tiempo al que aparece la primera distorsión en el cromatograma (correspondiente a la señal del eluyente).
- El tiempo de retención de una sal inorgánica (método exclusivo en cromatografía líquida de fase inversa). En este caso, se ha trabajado con una disolución de cromato de potasio (K_2CrO_4), ya que da señal en el detector de UV.

Se descarta el uso de compuestos orgánicos como la urea para la determinación del tiempo muerto, porque en sistemas cromatográficos de este estilo, el pico queda ligeramente retenido y esto hace que se cometa un error elevado en el cálculo del $\log k'$, especialmente cuando la sustancia objeto de estudio se encuentra poco retenida.

En este caso, el equipo de cromatografía líquida (HPLC) utilizado es un Alliance 2690 de la casa comercial *Waters*, con un detector modelo 2489 UV/VIS, también de *Waters*. El tratamiento de la información se realiza con un software *Empower 3*, comercializado también por la misma casa comercial. Este sistema tiene un volumen de retardo de $0,8 (\pm 0,02)^{16}$ mL. Este se ha determinado experimentalmente. Para ello, se coloca una pieza de volumen muerto substituyendo la columna y se realizan diez inyecciones de agua MilliQ a un flujo de 1 mL/min, utilizando como fase móvil agua MilliQ (A) y una disolución 0,1% acetona (B). El gradiente propuesto comienza en un 100% de agua MilliQ, donde se mantiene 2 min. Posteriormente, aumenta durante 10 min con un gradiente lineal hasta un 100 % del componente B de la fase móvil, donde se encuentra disuelto el marcador (acetona). Así, para cada uno de los cromatogramas obtenidos, se mide la distancia entre el minuto 2 y el momento en que realmente el marcador llega al detector.

Para determinar el tiempo muerto del sistema, se inyectan disoluciones de la sal cromato de potasio preparadas en una mezcla 30:70 agua/acetonitrilo, de diferentes concentraciones (0,2%, 0,4%, 0,8%, 2% y 5% p/v). Se prepara en este disolvente, para poder incorporar posteriormente anión cromato en la disolución de HAPs, para poder corregir el valor de tiempo de retención sobre cada uno de los cromatogramas, evitando utilizar valores promedio que ofrecen un mayor error. Sin embargo, la disolución debe contener una cierta proporción de agua para evitar que precipite la sal inorgánica. Cada una de las disoluciones se inyecta por duplicado.

En los cromatogramas obtenidos, la señal del anión cromato es previa a la distorsión que el eluyente provoca en la línea de base, por lo tanto, se considera más adecuado trabajar con el cromato para la determinación del tiempo muerto del sistema. En lo que hace referencia al rango de concentraciones inyectadas, las dos disoluciones más concentradas se descartan debido a que el pico de cromato es demasiado ancho y poco repetitivo. La concentración más

¹⁶ El intervalo de confianza con un 95% de confianza en la distribución de la *t* de Student.

diluida también se descarta ya que es demasiado baja. Las dos disoluciones de concentración media (0,4% y 0,8%) serían adecuadas para determinar el tiempo muerto del sistema pero se prefiere trabajar con la disolución de menor concentración (0,4% p/v) para asegurar la total disolución de la sal en las condiciones de trabajo.

Si se determina el tiempo muerto del sistema inyectando diez veces la disolución de sal de cromato de potasio al 0,4%, se obtiene un valor de 0,662 ($\pm 0,002$)¹³ minutos. A pesar de la elevada precisión del sistema cromatográfico, en este trabajo, se considera más adecuado corregir el tiempo de retención de los analitos con el tiempo muerto obtenido en la misma inyección.

2.3. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS. TIEMPOS DE RETENCIÓN Y COEFICIENTES DE RETENCIÓN DE LOS ANALITOS A ESTUDIO.

El tiempo de retención de los analitos a estudio es función del sistema cromatográfico utilizado. Para poder realizar el modelo de predicción es imprescindible que el método cromatográfico permita separar los analitos de estudio de tal manera que el tiempo de retención y su intervalo de confianza, no se solapen. Se fija como criterio de separación de los analitos una diferencia de tiempos de retención consecutivos superior a 0,25 min. Así, prima la separación ante el tiempo de cromatograma.

En las condiciones cromatográficas propuestas en la [Tabla 26], correspondientes a las condiciones cromatográficas definitivas del método para la separación de los 16+1 EPA-HAPs por HPLC, la diferencia de los tiempos de retención entre los analitos de estudio se presenta en la [Tabla 70]

Tabla 70. Diferencia entre los tiempos de retención de los HAPs a estudio, en el método cromatográfico definitivo para la separación de los 16+1 EPA-HAPs por HPLC (condiciones cromatográficas presentadas [Tabla 26].

| Compuesto (HAP) | <i>tr</i> (min) | Δtr (min) |
|----------------------|-----------------|-------------------|
| Naftaleno | 3,4 | --- |
| Acenaftileno | 4,2 | 0,8 |
| Acenafteno | 4,8 | 0,6 |
| Fluoreno | 5,0 | 0,2 |
| Fenantreno | 5,8 | 0,8 |
| Antraceno | 6,4 | 0,6 |
| Fluoranteno | 7,1 | 0,7 |
| Pireno | 7,5 | 0,4 |
| Benzo(a)antraceno | 8,7 | 1,2 |
| Criseno | 8,9 | 0,2 |
| Benzo(j)fluoranteno | 9,5 | 0,6 |
| Benzo(b)fluoranteno | 9,7 | 0,2 |
| Benzo(k)fluoranteno | 10 | 0,3 |
| Benzo(a)pireno | 10,4 | 0,4 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 10,7 | 0,3 |
| Benzo(ghi)perileno | 11,3 | 0,6 |
| Indeno(123-cd)pireno | 11,4 | 0,1 |

Nota: se marcan en naranja los incrementos de tiempo de retención inferiores a 0,3 min.

Como se puede observar, en el método de separación propuesto, la separación de alguna de las parejas de picos es insuficiente para poder tener diferencia significativa de tiempos de retención.

Por esta razón, se decide modificar el gradiente para conseguir la correcta resolución entre los tiempos de retención de los analitos a estudio, sin considerar importante el tiempo de cromatograma.

En la [Tabla 71], se presentan las nuevas condiciones cromatográficas que permiten separar todos los analitos a línea de base y es el sistema cromatográfico que se emplea para obtener los tiempos de retención de los HAPs que se utilizarán para calcular el valor del coeficiente de retención ($\log k'$) experimental.

Tabla 71. Condiciones cromatográficas adaptadas, para el estudio del modelo de predicción. Separación de los 16+1 EPA-HAPs por HPLC.

| Método 16+1 EPA-HAPs – Condiciones cromatográficas adaptadas para el modelo de predicción por HPLC | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Columna | Pursuit 3 PAH (100 X 4,6 mm, 3 μ m) |
| Volumen de inyección | 20 μ L |
| Temperatura columna | 33 °C |
| Flujo | 1,2 mL/min |
| Eluyente | [A] Agua MilliQ; [B] Acetonitrilo (ACN) |
| Gradiente elución | 0 min: [A] 50% [B] 50% 7 min: [A] 35% [B] 65% - Curva: 6 (lineal) 15 min: [A] 10% [B] 90% - Curva: 6 (lineal) 25-26 min: [A] 0% [B] 100% 28-30 min: [A] 50% [B] 50% (<i>Estabilización en condiciones iniciales</i>) |
| Tiempo de cromatograma | 30 min |
| Condiciones detección UV | 260 nm |

Como se puede observar, ha sido necesario aumentar el tiempo de cromatograma en 10 min e incluir una tercera rampa muy lenta para conseguir la correcta separación de los últimos picos.

Para obtener los datos experimentales se realizan diez inyecciones de un patrón de 1 mg/L preparado con los 16 EPA-HAPs y el B_JF que contiene el marcador de tiempo muerto a la concentración de 0,4 % p/v en una mezcla acetonitrilo/agua MilliQ (70:30).

En la [Tabla 72] se presentan los resultados de tiempos de retención expresados como el valor promedio de las diez inyecciones para cada uno de los compuestos. También se incluyen los valores de $\log k'$ promedio, calculados utilizando como tiempo muerto el valor obtenido en cada una de las inyecciones realizadas. Tanto para el tiempo de retención como para el $\log k'$, se incluyen sus intervalos de confianza calculados con una probabilidad del 95%.

Como se puede observar, aunque el tiempo de cromatograma ha aumentado, se ha conseguido una separación entre picos superior a 0,25 en todos los casos.

Tabla 72. Datos experimentales de tiempos de retención (tr) y log k, obtenidas en el método cromatográfico adaptado para el estudio del modelo de predicción de los 16+1 EPA-HAPs, por HPLC.

| Compuesto (HAP) | tr(min) | Δtr (min) | Log k' experimental |
|-------------------------|----------------|-------------------|-----------------------|
| 01-Naftaleno | 4,572 ± 0,006 | 0,76 | 0,771 ± 0,002 |
| 02-Acenaftileno | 5,333 ± 0,006 | 1,24 | 0,849 ± 0,002 |
| 03-Acenafteno | 6,573 ± 0,005 | 0,27 | 0,951 ± 0,002 |
| 04-Fluoreno | 6,843 ± 0,005 | 0,91 | 0,970 ± 0,002 |
| 05-Fenantreno | 7,755 ± 0,005 | 0,86 | 1,030 ± 0,002 |
| 06-Antraceno | 8,615 ± 0,005 | 1,08 | 1,080 ± 0,002 |
| 07-Fluoranteno | 9,695 ± 0,004 | 0,74 | 1,135 ± 0,002 |
| 08-Pireno | 10,436 ± 0,004 | 2,31 | 1,169 ± 0,002 |
| 09-Benzo(a)antraceno | 12,742 ± 0,003 | 0,39 | 1,261 ± 0,001 |
| 10-Criseno | 13,133 ± 0,003 | 1,43 | 1,275 ± 0,001 |
| 11-Benzo(j)fluoranteno | 14,566 ± 0,002 | 0,49 | 1,322 ± 0,001 |
| 12-Benzo(b)fluoranteno | 15,056 ± 0,003 | 0,69 | 1,337 ± 0,001 |
| 13-Benzo(k)fluoranteno | 15,742 ± 0,002 | 0,81 | 1,358 ± 0,001 |
| 14-Benzo(a)pireno | 16,549 ± 0,002 | 1,14 | 1,380 ± 0,001 |
| 15-Dibenzo(ah)antraceno | 17,686 ± 0,003 | 1,01 | 1,410 ± 0,001 |
| 16-Benzo(ghi)perileno | 18,691 ± 0,003 | 0,36 | 1,435 ± 0,001 |
| 17-Indeno(123-cd)pireno | 19,053 ± 0,004 | 0,76 | 1,444 ± 0,001 |

Los valores promedio de $\log k'$ (marcados en negrita en la [Tabla 72]), son los valores experimentales a partir de los cuales se desarrollarán los modelos QSRR de predicción.

3. DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE LA METODOLOGÍA QSRR.

3.1. QUIMIOTECA VIRTUAL.

La parte de simulación computacional del presente trabajo se inicia con la creación de la quimioteca virtual de los HAPs a estudio. Así, se construye una base de datos (quimioteca) que incluye la estructura química de las moléculas, los valores $\log k'$ experimentales y el conjunto de descriptores que se utilizarán para crear los modelos de predicción. Para ello, se modelan las moléculas de los 17 HAPs a estudio con el programario MOE 2010 (Inc. Chemical Computing Group, V. 2010.10 (2010)), y se exportan los datos de la quimioteca virtual, siempre definiendo la geometría de las moléculas en la conformación de mínima energía.

Esta base de datos, a su vez, se divide en dos grupos, las moléculas que constituyen el conjunto de entrenamiento (*training*) y las que forman parte del conjunto de validación (*test*). El primer grupo está formado por 12 de los 17 HAPs a estudio y es con la que se obtendrá el modelo QSRR. El segundo grupo de 5 compuestos, se utilizará para comprobar la eficacia de la predicción del modelo desarrollado.

Para la selección de los compuestos que formarán parte del grupo de entrenamiento o de validación se han considerado los siguientes aspectos:

- Las moléculas que se eluyen a los extremos del cromatograma (Na, Acy, Ace, Fl, BghiP e IP) permanecerán en el grupo de entrenamiento, así, las dos moléculas siguientes (Fe y DiBahA) pasan a formar parte del *test*. Esta primera separación se basa en que en los extremos tienen una menor representación en el conjunto de los analitos a estudio, y por lo tanto, su información química se debe incluir cuando se genera el modelo de predicción.
- Otro punto que se ha considerado para discernir entre los dos conjuntos es la isomería de los HAPs. Los compuestos que faltan presentan en su estructura 16 (F y Pyr), 18 (BaA y Cry) o 20 carbonos (BjF, BbF, BkF y BaP). Así, se decide acabar de formar el grupo de *test* con un compuesto de cada tipo (Pyr, Cry y BbF).

Así, la base de datos del grupo de entrenamiento estará formada por los siguientes compuestos: Na, Acy, Ace, Fl, An, F, BaA, BjF, BkF, BaP, BghiP e IP. Mientras que la base de datos del grupo de validación la forman Fe, Pyr, Cry, BbF y DiBahA.

Una vez formadas las dos bases de datos, se procede a realizar la descripción matemática de las propiedades de los compuestos mediante los descriptores moleculares.

3.2. DESCRIPTORES MOLECULARES.

Como se ha comentado en la introducción de las metodologías QSRR, los descriptores moleculares se utilizan para crear los modelos de predicción. Estos descriptores se agrupan en diferentes categorías según la información a que hacen referencia (topología, geometría, propiedades electrónicas o propiedades físico-químicas de las moléculas). Debido al elevadísimo número de descriptores disponibles, es necesario realizar una criba en función de las características de las moléculas a estudio con la finalidad de seleccionar los descriptores más adecuados para el posterior desarrollo de los modelos QSRR.

Partiendo de la base de descriptores disponibles en el programario MOE 2010, se realiza una primera selección tomando como criterio inicial tanto los resultados bibliográficos como criterios químicos. La segunda selección se basa en algoritmos matemáticos de búsqueda.

3.2.1. Selección de descriptores (I): selección basada en resultados bibliográficos y criterios químicos.

En lo que hace referencia a la selección de los descriptores, lo primero que se ha tenido en cuenta es la estructura química de las moléculas a estudio. Los HAPs son una familia de compuestos que se caracterizan por su estructura plana, compuesta por anillos aromáticos fusionados. En este caso, los compuestos que se incluyen tienen entre 10 y 22 átomos de carbono. Así, los primeros descriptores que se han considerado son el número de carbonos (a_{nC}) y el número de anillos aromáticos de 6 carbonos (n_{anell6}). Este último, no está

disponible en el programario MOE 2010, por lo que ha sido necesario incluirlo manualmente en la base de datos.

Siguiendo el estudio de la estructura química de los compuestos, se observa que algunos de ellos presentan una forma más alargada que otros, es decir, que algunos tienen los anillos más unidos mostrando formas más circulares. Por esta razón, se ha buscado descriptores relacionados con la globularidad o esfericidad de las moléculas. Los dos descriptores disponibles que describen esta propiedad son los llamados en el programario MOE, *glob* y *vsurf_G*. El primero de ellos proporciona información sobre la estructura tridimensional dando un valor entre 0 y 1, según si la molécula es de una, dos o tres dimensiones. El descriptor *vsurf_G* proporciona el valor de globularidad superficial. Considerando los resultados preliminares obtenidos, estos dos descriptores proporcionan resultados prácticamente idénticos. Por esta razón, sólo se utiliza uno de ellos (*glob*) para realizar los modelos QSRR.

Otro de los descriptores que se ha considerado para desarrollar los modelos QSRR, es el Índice de Kier (*kier1*). Este descriptor hace referencia a la ciclación de las moléculas y considera los enlaces entre los átomos.

Considerando la isomería de los compuestos, un mismo átomo presenta un comportamiento diferente según la estructura que lo rodea. Por esta razón, se quiere introducir un descriptor que relacione la posición de un átomo con una propiedad de la molécula. El descriptor seleccionado entre los disponible, es el *BCUT_SMR_0*, el que calcula una matriz de adyacencia que está modificada en su diagonal con la refractividad molar del compuesto.

Un parámetro considerado en muchos de los modelos QSRR de la bibliografía consultada, es la energía potencial de los compuestos. (Baggiani, Anfossi, Baravalle, Giovannoli, & Giraudi, 2007) (Kaliszan, 1987). Debido a la conjugación que presentan los compuestos a estudio, su energía potencial es inferior que la de su análogo alifático. Por este motivo, se considera adecuado incluir la energía potencial como descriptor (*E*), además, de los descriptores *PM3_HOMO* y *PM3_LUMO* que hacen referencia al orbital molecular ocupado de mayor y menor energía, respectivamente. Ambos se han calculado con el método semiempírico PM3.

Dentro de la categoría de propiedades físico-químicas, entre la gran variedad de descriptores disponibles, se escoge el logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua (*logP*) como descriptor marcador de la hidrofobicidad del compuesto. Esta propiedad, relaciona la solubilidad de un compuesto en un disolvente orgánico y en agua, y como se trabaja con un grupo de compuestos altamente hidrofóbicos, parece una propiedad importante a considerar. Además, cabe destacar, que este descriptor se ha utilizado en modelos de predicción consultados en bibliografía. (Baggiani, Anfossi, Baravalle, Giovannoli, & Giraudi, 2007) (Duchowicz, Bucknum, & Castro, 2007)

Otra de las propiedades utilizadas habitualmente como descriptor en los métodos de HPLC es el momento dipolar. (Lippa, Sander, & Wise, 2004) (Collantes, Tong, Welsh, & Zielinski, 1996)

Los HAPs son moléculas neutras, pero la presencia de los dobles enlaces provoca que se dé una redistribución interna de la carga. Esta distribución es lo que se conoce como momento dipolar

de la molécula, por este motivo, se ha considerado como posible descriptor (*PM3_dipole*). Además, el momento dipolar tiene un gran componente electrostático, categoría que aún no tenía representación dentro de los descriptores seleccionados.

El último de los descriptores escogido para el desarrollo de los modelos QSRR es el *PEOE_VSA_HYD*. La idea de incluir este descriptor viene de buscar una alternativa al coeficiente de partición octanol-agua, con la peculiaridad que además de considerar la superficie hidrofóbica, también incluye en su cálculo un componente electrostático mediante cargas parciales.

En la [Tabla 73], se presenta un resumen de los descriptores seleccionados, con su definición y la tipología incluida en el programario MOE.

Tabla 73. Descriptores moleculares seleccionados bibliográficamente y atendiendo a criterio químicos, propuestos para diseñar el modelo de predicción del análisis de HAPs por HPLC.

| Descriptor | Definición | Tipología MOE |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| a_nC | Número de átomos de carbono | 2D |
| n_anell6 | Número de anillos aromáticos de 6 | 2D* |
| glob | Globularidad molecular | I3D |
| Kier1 | Primer índice de kappa: $(n-1)^2/m^2$ Donde n es el número de átomos y m el número de enlaces (Hall & Kier, 1991) | 2D |
| BCUT_SMR_0 | Matriz de adyacencia que utiliza la contribución atómica de la refractividad molar (Wildman & Crippen, 1999) | 2D |
| E | Energía potencial | I3D |
| PM3_HOMO | Energía (eV) del orbital molecular más alto ocupado, calculado utilizando el PM3 Hamiltoniano (Steward, 1993) | I3D |
| PM3_LUMO | Energía (eV) del orbital molecular libre más pequeño, calculado utilizando el PM3 Hamiltoniano (Steward, 1993) | I3D |
| logP | Logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua | 2D |
| PM3_dipole | Momento dipolar, calculado utilizando el PM3 Hamiltoniano (Steward, 1993) | I3D |
| PEOE_VSA_HYD | El área de la superficie hidrofóbica total de Van del Waals | 2D |

**incluido en el programario MOE manualmente*

En la [Figura 45], se presentan los valores normalizados de los descriptores para cada uno de los analitos de estudio.

| NOM | a_nc | n_anillo6 | glob | E | PM3_HOMO | PM3_LUMO | BCUT_SMR_0 | Kier1 | PEOE_VSA_HYD | logP(o/w) | PM3_dipole |
|-------------|------|-----------|----------|---------|----------|----------|------------|--------|--------------|-----------|------------|
| 01 – Na | 10 | 2 | 1,59E-08 | 31,000 | -8,835 | -0,408 | -1,854 | 6,694 | 136,579 | 3,128 | 0,000 |
| 02 – Acey | 12 | 2 | 2,24E-08 | 49,941 | -9,055 | -1,062 | -1,835 | 7,408 | 140,996 | 4,102 | 0,294 |
| 03 – Ace | 12 | 2 | 0,038 | 44,395 | -8,590 | -0,352 | -2,129 | 7,408 | 142,420 | 3,634 | 0,560 |
| 04 – Fl | 13 | 2 | 0,011 | 48,524 | -8,842 | -0,335 | -1,983 | 8,320 | 158,229 | 4,113 | 0,367 |
| 05 – Pa* | 14 | 3 | 1,52E-08 | 51,299 | -8,740 | -0,535 | -1,872 | 9,242 | 174,037 | 4,348 | 0,015 |
| 06 – An | 14 | 3 | 3,99E-09 | 45,485 | -8,248 | -0,970 | -1,871 | 9,242 | 174,037 | 4,424 | 0,000 |
| 07 – Fa | 16 | 3 | 1,18E-08 | 74,178 | -8,725 | -1,044 | -1,830 | 9,972 | 178,454 | 5,074 | 0,237 |
| 08 – Pyr* | 16 | 4 | 1,47E-08 | 58,332 | -8,249 | -1,010 | -1,889 | 9,972 | 178,454 | 4,912 | 0,002 |
| 09 – BaA | 18 | 4 | 7,16E-09 | 66,217 | -8,328 | -0,934 | -1,881 | 11,796 | 211,495 | 5,644 | 0,017 |
| 10 – Cry* | 18 | 4 | 5,53E-09 | 72,849 | -8,496 | -0,783 | -1,882 | 11,796 | 211,495 | 5,568 | 0,000 |
| 11 – BbF | 20 | 4 | 7,43E-09 | 93,788 | -8,439 | -1,278 | -1,859 | 12,535 | 215,912 | 6,294 | 0,355 |
| 12 – BbF* | 20 | 4 | 1,00E-08 | 91,809 | -8,663 | -1,072 | -1,855 | 12,535 | 215,912 | 6,331 | 0,272 |
| 13 – BkF | 20 | 4 | 7,92E-09 | 89,093 | -8,399 | -1,013 | -1,859 | 12,535 | 215,912 | 6,370 | 0,136 |
| 14 – BaP | 20 | 5 | 9,15E-09 | 78,402 | -8,042 | -1,221 | -1,895 | 12,535 | 215,912 | 6,169 | 0,026 |
| 15 – DiBaA* | 22 | 5 | 5,25E-09 | 86,581 | -8,377 | -0,918 | -1,888 | 14,352 | 248,952 | 6,864 | 0,003 |
| 16 – BghiP | 22 | 6 | 1,03E-08 | 89,535 | -8,139 | -1,167 | -1,907 | 13,309 | 220,329 | 6,694 | 0,027 |
| 17 – IP | 22 | 5 | 8,84E-09 | 102,070 | -8,238 | -1,384 | -1,874 | 13,309 | 220,329 | 6,895 | 0,429 |

Figura 45. Valores normalizados de los descriptores seleccionados bibliográficamente y atendiendo a criterios químicos, para los 17 HAPs a estudio, calculados con el programario MOE. En (*) se marca el conjunto de moléculas que forman parte del grupo de validación.

Si se analizan los valores de los descriptores propuestos tanto en el rango de valores con los que se trabajará en el ajuste (si se propone como descriptor del modelo) como en lo que hace referencia a las separaciones críticas, (especialmente en los que hacen referencia a los isómeros) se puede decir que:

- El número de carbonos (a_{nc}) oscila entre el 10 y el 22, mientras que el número de anillos aromáticos de 6 carbonos ($n_{anillo6}$) lo hace entre 2 y 6. Ninguno de estos dos descriptores es capaz de diferenciar isómeros, excepto en el caso de la pareja Ace-Fl.
- El descriptor que representa la globularidad de la molécula ($glob$), es en todos los casos muy pequeño y oscila entre 10^{-2} y 10^{-9} y a los valores más elevados les corresponde al Ace-Fl que se eluyen muy al inicio del cromatograma. En este caso, como era de esperar, si que difiere entre los isómeros de posición.
- De los descriptores que hacen referencia a la energía potencial de los compuestos (E, PM3_HOMO y PM3_LUMO), el único que es positivo es la energía potencial (E) y tiene valores altos que oscilan entre 31 y 102 kcal/mol. Los descriptores PM3_HOMO y PM3_LUMO, en cambio, son negativos y oscilan, respectivamente, entre -8,0 y -9,0 eV, y -0,3 a -1,4 eV. En los tres casos, existe diferencia entre los valores obtenidos para los diferentes isómeros.
- Los descriptores $kier1$, relacionado con la ciclación de las moléculas, y el $BCUT_SMR_0$ relacionado con la posición de los átomos en una matriz de adyacencia, que tienen

valores entre 6,7 y 14, y entre -1,8 y -2,1, respectivamente, no son capaces de discernir entre isómeros.

- Los descriptores *logP* y *PM3_dipole*, muy utilizados en ajustes de HPLC por hacer referencia a la hidrofobicidad del compuesto y al momento dipolar, permiten diferenciar entre isómeros y sus valores oscilan, respectivamente, entre 3,1-6,9 y 0,0-0,4. Sin embargo, el descriptor PEOE_VSA_HYD, escogido como alternativa al logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua (*logP*) no es capaz de diferenciar entre los isómeros.

A la hora de escoger los descriptores para diseñar el modelo de predicción es importante tener en cuenta, tanto los descriptores como sus valores en los analitos de estudio como la posibilidad que tienen los descriptores escogidos de diferenciar los isómeros. Si no se tienen en cuenta todas estas consideraciones no se tendrá un modelo adecuado que describa la separación de los compuestos a estudio.

3.2.2. Selección de descriptores (II): Algoritmos de selección.

A continuación, se presentan los descriptores seleccionados mediante algoritmos de búsqueda, concretamente algoritmos genéticos, que se han obtenido mediante el programario *RapidMiner*¹⁷, que permite hallar la mejor combinación posible según unas determinadas especificaciones descritas previamente.

Para llevar a cabo esta selección, se han calculado todos los descriptores 2D disponibles en el programario MOE (en este caso, no se han considerado descriptores 3D). Así, con este grupo de descriptores y utilizando los algoritmos genéticos, el programa hace una selección de la mejor combinación, de entre dos y seis descriptores, con la finalidad de optimizar la predicción del modelo.

¹⁷ GmbH Rapid-I. Rapidminer 5.1, 2009

• **Algoritmos genéticos.**

Los algoritmos genéticos (*Genetic Algorithms*, AG) son algoritmos de optimización estocásticos basados en un conjunto de pasos sucesivos que tienen como finalidad seleccionar la mejor combinación de variables que maximizan una función objetivo. (Terfloth & Gasteiger, 2001)

El funcionamiento del AG simula la transferencia de información genética de los organismos biológicos y se basa en el concepto de la selección natural para hallar de forma progresiva, nuevas y mejores soluciones. (Judson, 1997)

El proceso iterativo consta de tres operadores fundamentales: la selección, el cruce y la mutación [Figura 46].

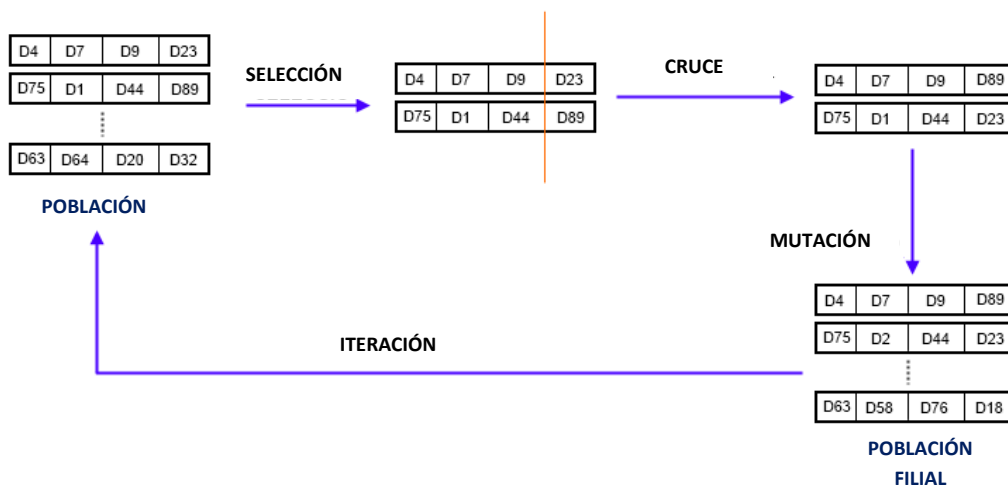


Figura 46. Esquema de selección de descriptores mediante algoritmos genéticos.

El proceso de selección se inicia con la entrada de las variables, en este caso, los descriptores moleculares, y las condiciones para hacer la selección. Las condiciones de selección escogidas corresponden a una combinación de entre dos y seis descriptores que presente el mejor coeficiente de determinación (R^2) para la predicción del posterior modelo, obtenido a partir del ajuste por mínimos cuadrados (PLS). De este primer paso, se generan n combinaciones de descriptores (**población**).

De esta población inicial, de forma aleatoria, se escogen dos de las combinaciones de descriptores generadas sobre las cuales tiene lugar el cruce de información, dando como resultados dos nuevas combinaciones diferentes a las que forman la población inicial (**hijos**). Los hijos generados pueden sufrir alteraciones al azar, mutaciones, de la combinación de descriptores, tal y como sucede con el material genético humano. Todos los hijos que se generan a partir de la combinación de descriptores de la población inicial, forman lo que se conoce como **población filial**.

Finalmente, se juntan las dos poblaciones y entre todas las combinaciones generadas, se escogen aquellas que presentan los mejores valores de R^2 , formando una nueva población.

El proceso se repite nuevamente hasta obtener la mejor combinación de descriptores.

Así, este método permite identificar un conjunto de cinco descriptores que ofrecen la mejor combinación para la realización del modelo de predicción.

En la [Tabla 74], se presentan los descriptores escogidos según algoritmos genéticos, además de su definición. En este caso, todos los descriptores son 2D porque son los únicos que se han considerado para realizar la selección.

Tabla 74. Descriptores moleculares seleccionados según algoritmos genéticos, propuestos para diseñar el modelo de predicción del análisis de HAPs por HPLC.

| Descriptor | Definición | Tipología MOE |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| BCUT_SMR_3 | Matriz de adyacencia que utiliza la contribución atómica de la refractividad molar (Wildman & Crippen, 1999) | 2D |
| KierA1 | Primer índice de kappa: $(n-1)^2/m^2$ Donde n es el número de átomos y m el número de enlaces (Hall & Kier, 1991) | 2D |
| PEOE_RPC (-) | Carga parcial negativa relativa | 2D |
| Q_RPC (-) | Carga parcial negativa relativa | 2D |
| Vdw_area | Área de la superficie de Van der Waals (Å ²) | 2D |

**incluido en el programario MOE manualmente*

Los valores de los descriptores seleccionados mediante AG de los 17 analitos de estudio se presentan en la [Tabla 75].

Tabla 75. Valores de los descriptores moleculares seleccionados según algoritmos genéticos, propuestos para diseñar el modelo de predicción del análisis de HAPs por HPLC.

| Nombre | BCUT_SMR_3 | KierA1 | PEOE_RPC(-) | Q_RPC(-) | vdw_area |
|-----------------------------|------------|--------|-------------|----------|----------|
| 01-Naftaleno | 2,513 | 4,263 | 0,123 | 0,125 | 136,579 |
| 02-Acenaftileno | 2,638 | 4,747 | 0,122 | 0,142 | 140,996 |
| 03-Acenafteno | 2,783 | 5,137 | 0,122 | 0,126 | 142,420 |
| 04-Fluoreno | 2,729 | 5,542 | 0,108 | 0,101 | 158,229 |
| 05-Fenantreno (*) | 2,566 | 5,947 | 0,098 | 0,100 | 174,037 |
| 06-Antraceno | 2,561 | 5,947 | 0,098 | 0,100 | 174,037 |
| 07-Fluoranteno | 2,686 | 6,437 | 0,098 | 0,100 | 178,454 |
| 08-Pireno (*) | 2,612 | 6,437 | 0,097 | 0,100 | 178,454 |
| 09-Benzo(a)antraceno | 2,592 | 7,632 | 0,082 | 0,083 | 211,495 |
| 10-Criseno (*) | 2,596 | 7,632 | 0,082 | 0,083 | 211,495 |
| 11-Benzo(j)fluoranteno | 2,700 | 8,125 | 0,082 | 0,083 | 215,912 |
| 12-Benzo(b)fluoranteno (*) | 2,698 | 8,125 | 0,082 | 0,083 | 215,912 |
| 13-Benzo(k)fluoranteno | 2,696 | 8,125 | 0,082 | 0,083 | 215,912 |
| 14-Benzo(a)pireno | 2,633 | 8,125 | 0,082 | 0,083 | 215,912 |
| 15-Dibenzo(ah)antraceno (*) | 2,610 | 9,317 | 0,070 | 0,071 | 248,952 |
| 16-Benzo(ghi)perileno | 2,663 | 8,640 | 0,081 | 0,083 | 220,329 |
| 17-Indeno(123-cd)pireno | 2,713 | 8,640 | 0,082 | 0,083 | 220,329 |

(*) Conjunto de validación

Analizando los descriptores escogidos según los algoritmos genéticos para establecer los modelos de predicción correspondientes al análisis de HAPs por HPLC, se puede destacar que:

- El primer descriptor seleccionado (*BCUT_SMR_3*) es una variante del descriptor escogido anteriormente, *BCUT_SMR_0*. Los dos comparten la base teórica pero difieren en la realización del cálculo. Esto es lo mismo que sucede con el *kierA*, que es análogo del *kier1*.
- El tercer y cuarto descriptor escogido por AG, *PEOE_RPC(-)* y *Q_RPC(-)*, son equivalentes y los dos comparten la misma base de cálculo. En realidad, parece que de los 186 descriptores disponibles en la base de datos y que se han utilizado para realizar esta selección, lo más lógico sería escoger descriptores completamente diferentes. Sin embargo, en este caso, estos dos descriptores son prácticamente idénticos. La diferencia que presentan es que el primer descriptor (*PEOE_RPC(-)*) considera interacciones hidrofóbicas además de las cargas parciales.
- El último de los descriptores seleccionados, *vdw_area*, corresponde a una propiedad física de las moléculas, y hace referencia a la superficie molecular formada por la intersección de esferas atómicas de radios de Van der Waals. En cierta manera, este descriptor podría equipararse con el descriptor *PEOE_VSA_HYD* escogido en el apartado anterior, ya que los dos contienen información específica sobre la conformación espacial de la molécula.

A nivel general, comparando la primera selección de descriptores con los descriptores escogidos mediante algoritmos genéticos, se puede observar que son muy parecidos. Esto indica que la selección realizada según criterios químicos y resultados bibliográficos parece adecuada para desarrollar el modelo QSRR.

Aun así, es importante destacar, que de los cinco descriptores escogidos según AG, sólo el *BCUT_SMR_3*, es capaz de diferenciar isómeros.

3.3. MODELO QSRR.

Una vez obtenida la quimioteca virtual y estudiados los descriptores moleculares que definen las moléculas de estudio, el siguiente paso es el desarrollo de los modelos QSRR.

Para la creación y posterior análisis de los modelos, se ha seguido el siguiente procedimiento:

- En primer lugar se selecciona alguno de los descriptores anteriormente mencionados calculados con las moléculas cuya optimización de la geometría se realiza en su conformación de mínima energía.
- Mediante un ajuste por mínimos cuadrados del coeficiente de retención ($\log k'$) a partir de los descriptores se obtiene la ecuación que describe el modelo. Este ajuste se realiza sobre el grupo de moléculas de entrenamiento (*training*).

- Sobre el segundo grupo de moléculas de validación se aplica el modelo obtenido que retorna el valor del $\log k'$ a partir del cual se evaluará la capacidad de predicción del modelo.

Para determinar la adecuación del modelo, se fija como criterio de aceptación un valor de coeficiente de determinación (R^2) superior a 0,95, tanto en lo que hace referencia al entrenamiento como con la validación del modelo. Además, también se determina, en los dos casos, el valor del error cuadrático medio del ajuste (*Root Mean Square Error*, RMSE¹⁸).

A continuación se describen los modelos de predicción ensayados con los diferentes descriptores.

3.3.1. Modelos de predicción ensayados.

Se describen los seis modelos de predicción propuestos. En todos los casos se incluye, tanto los descriptores escogidos como la ecuación resultante del ajuste por mínimos cuadrados, con la importancia relativa que representan cada uno de los descriptores utilizados. Además, se presenta un gráfico con la relación entre el $\log k'$ experimental ($\log k'_{exp}$) y el $\log k'$ obtenido con el modelo ($\log k'_{M_X}$). Cuanto más cercanos se encuentren los puntos a la recta $y=x$, mejor se considerará el ajuste y, en principio, el modelo tendrá mejores resultados de R^2 y RMSE. Además, esta representación, permite obtener conclusiones de los resultados individuales obtenidos para las diferentes moléculas tanto del grupo de entrenamiento como del de validación.

Modelo_01.

Descriptores: $a_{nc}, n_{anillo6}, glob, E, PM3_HOMO, PM3_LUMO, BCUT_SMR_0$ y $kier1$.

Ecuación:

| | | |
|-------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| $\log k' =$ | 2,06382 | Importancia relativa / % |
| | +0,08931 · a_{nc} | 58,51 |
| | -0,06346 · n_{anillo6} | 13,44 |
| | -0,00017 · glob | 3E-04 |
| | -0,00168 · E | 6,03 |
| | +0,18907 · PM3_HOMO | 9,21 |
| | +0,02548 · PM3_LUMO | 1,43 |
| | +0,07101 · BCUT_SMR_0 | 0,90 |
| | -0,02708 · Kier1 | 10,47 |

¹⁸ $RMSE = \sqrt{\frac{\sum(\log k'_{M} - \log k'_{exp})^2}{n}}$

Representación de los datos [Figura 47]:

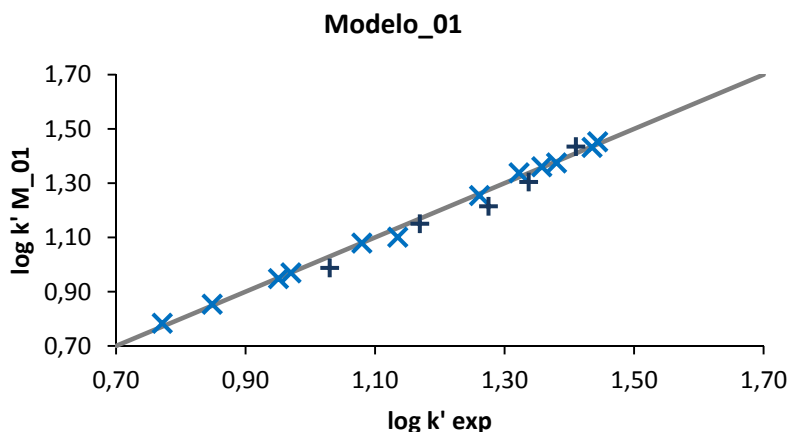


Figura 47. Comparación del valor de $\log k'$ que se ha predicho con el Modelo_01, respecto del valor experimental para el conjunto de entrenamiento (X, $R^2=0,997$, $RMSE=0,012$) y de validación (+, $R^2=0,973$, $RMSE = 0,038$)

Resultados:

Este primer modelo cumple con los criterios de aceptación establecidos, con un coeficiente R^2 0,997 para el grupo de entrenamiento, y un valor de 0,973 para la validación.

A pesar de los buenos resultados obtenidos, el Modelo_01 incluye un número demasiado elevado de descriptores (8) respecto al total de datos disponibles en el conjunto de entrenamiento (12). Este hecho puede provocar que el modelo se encuentre sobre-dimensionado.

Si se analiza la ecuación obtenida se observa que cuatro de los ocho descriptores utilizados (a_{nc} , n_{anell6} , $PM3_HOMO$ y $kier1$) aportan el 90% de la información que describe el $\log k'$. Esto es indicativo de que los descriptores con menor contribución son prescindibles a la hora de obtener un buen ajuste.

Modelo_02.

Descriptores: a_{nc} , $PEOE_VSA_HYD$, $\log P$ y $PM3_dipole$

Ecuación:

| | |
|-----------------------------|---------------------------------|
| log k' = | |
| 0,10092 | Importancia relativa / % |
| +0,07108 · a_{nC} | 51,86 |
| +0,00298 · $PEOE_VSA_HYD$ | 17,52 |
| -0,13067 · $\log P$ | 28,98 |
| +0,04911 · $PM3_dipole$ | 1,64 |

Representación de los datos [Figura 48]:

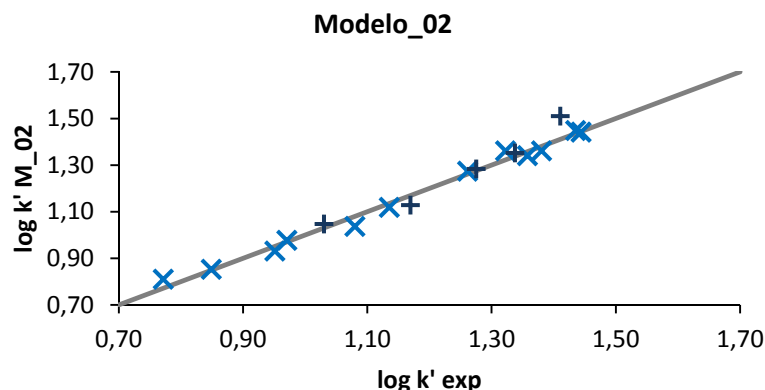


Figura 48. Comparación del valor de $\log k'$ que se ha predicho con el Modelo_02, respecto del valor experimental para el conjunto de entrenamiento (X, $R^2=0,989$, $RMSE=0,023$) y de validación (+, $R^2=0,950$, $RMSE = 0,050$)

Resultados:

En el Modelo_02 se incluyen los descriptores que no se habían considerado en el Modelo_01, y se incluyen dos descriptores (PEOE_VSA_HYD y logP) que introducen un mayor carácter de hidrofobicidad.

Este segundo modelo de predicción ofrece valores de R^2 de 0,989 y 0,950 para el grupo de entrenamiento y de validación, respectivamente. Así, en ambos casos se cumple el criterio de aceptación establecido.

Este nuevo modelo incluye cuatro descriptores, por lo que soluciona el problema que tenía el Modelo_01 de la posible sobredimensión del modelo. Sin embargo, como se puede observar, no es capaz de diferenciar entre las moléculas de uno de los extremos del cromatograma (BghiP e IP) y empeora la capacidad de predicción.

Modelo_03.

Descriptores: a_{nc} , PEOE_VSA_HYD y PM3_dipole.

Ecuación:

| | | |
|-------------|-------------------------|---------------------------------|
| $\log k' =$ | 0,08581 | Importancia relativa / % |
| | +0,03253 · a_{nC} | 56,82 |
| | +0,00285 · PEOE_VSA_HYD | 40,11 |
| | +0,03836 · PM3_dipole | 3,07 |

Representación de los datos [Figura 49]:

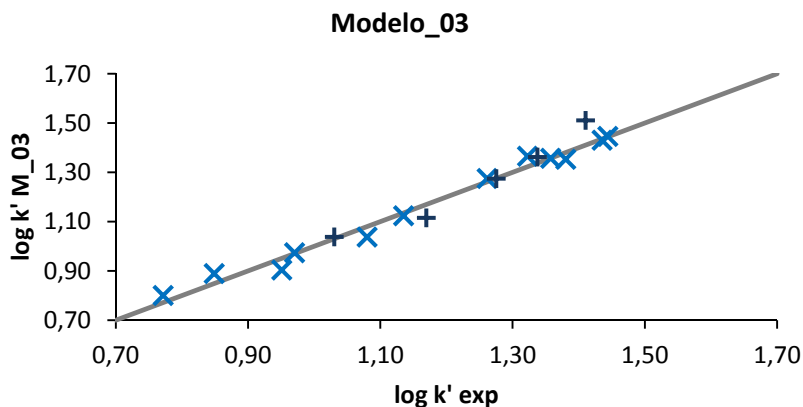


Figura 49. Comparación del valor de $\log k'$ que se ha predicho con el Modelo_03, respecto del valor experimental para el conjunto de entrenamiento (X, $R^2=0,985$, $RMSE=0,028$) y de validación (+, $R^2=0,949$, $RMSE = 0,053$)

Resultados:

El Modelo_03 es comparable al Modelo_02 pero con un descriptor menos. Se ha eliminado el $\log P$ (segundo en importancia en el Modelo_02) porque aportaba información de hidrofobicidad como el descriptor $PEOE_VSA_HYD$.

El ajuste obtenido sigue siendo prácticamente igual que el Modelo_02 aunque cuenta con un descriptor menos. El coeficiente R^2 para el conjunto de entrenamiento es de 0,985 y para el de validación de 0,949, por lo que también cumple con el criterio de aceptación establecido.

Como se puede observar en los resultados obtenidos ([Figura 48] y [Figura 49]), el Modelo_02 y el Modelo_03 presentan el mismo perfil, no sólo en el tipo de descriptores sino en su peso dentro de la expresión del $\log k'$. La importancia del $\log P$ en el Modelo_02 recae sobre el $PEOE_VSA_HYD$ en el Modelo_03, el otro descriptor de hidrofobicidad. Este efecto permite afirmar que la hidrofobicidad de la molécula es una propiedad importante a la hora de describir el coeficiente de retención de los analitos a estudio.

Modelo_04.

Debido al elevado número de posibles combinaciones que existen con los descriptores seleccionados según criterios químicos y la búsqueda bibliográfica, para diseñar el cuarto modelo se ha utilizado el programa RapidMiner. Este programa, como se ha comentado en el apartado *Selección de descriptores (II): Algoritmos de selección.*, se basa en algoritmos genéticos para hacer la selección de los descriptores. El objetivo, en este caso, es obtener la

mejor combinación de los 11 descriptores seleccionados según criterios químicos o búsqueda bibliográfica, con la finalidad de conseguir un modelo enfocado en la mejor capacidad de predicción.

Descriptores: a_{nc} , n_{anell6} , $PM3_HOMO$ y $PEOE_VSA_HYD$.

Ecuación:

| | | | |
|-------------|---------------------------------|---------------------------------|-------|
| $\log k' =$ | 1,97357 | Importancia relativa / % | |
| | $+0,05711 \cdot a_{nC}$ | | 66,00 |
| | $-0,04546 \cdot n_{anillo6}$ | | 16,99 |
| | $+0,18990 \cdot PM3_HOMO$ | | 16,32 |
| | $+0,00007 \cdot PEOE_VSA_HYD$ | | 0,60 |

Representación de los datos [Figura 50]:

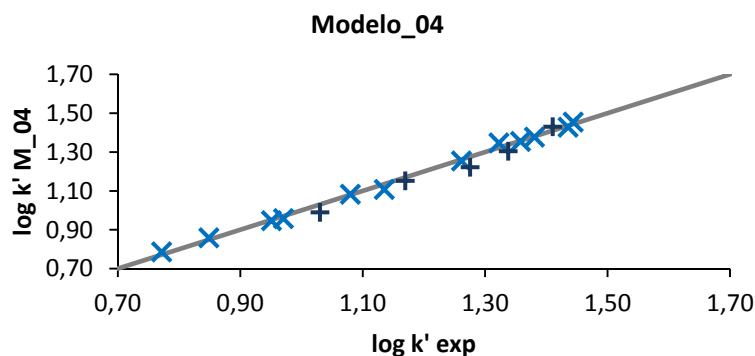


Figura 50. Comparación del valor de $\log k'$ que se ha predicho con el Modelo_04, respecto del valor experimental para el conjunto de entrenamiento (X, $R^2=0,997$, $RMSE=0,013$) y de validación (+, $R^2=0,978$, $RMSE = 0,035$)

Resultados:

Hasta el momento, el Modelo_04 es el que presenta mejores resultados tanto para las moléculas que forman parte del grupo de entrenamiento como las de validación. Además, a diferencia de lo que sucedía con los dos modelos anteriores (Modelo_02 y Modelo_03), define mejor el tiempo de retención de las moléculas de los extremos.

Si se analiza la ecuación correspondiente al Modelo_04 más detalladamente y en especial la importancia relativa de cada uno de los descriptores que la forman, se observa que la mayor contribución viene dada por el número de átomos de carbono (a_{nc}), igual que sucede en todos los modelos presentados hasta el momento. Siguiendo a este descriptor, en importancia relativa, se encuentran el número de anillos aromáticos (n_{anell6}) y el orbital molecular ocupado de mayor energía ($PM3_HOMO$). Estos tres descriptores son tres de los cuatro descriptores de mayor importancia en el Modelo_01. Finalmente, el $PEOE_VSA_HYD$

con un porcentaje inferior al 1%, lleva a concluir que la hidrofobicidad no es una propiedad significativa para describir el coeficiente de retención de esta familia de analitos.

Modelo_05.

Así, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el Modelo_04, para desarrollar el Modelo_05 se plantea la posibilidad de diseñar un modelo con sólo los tres descriptores de mayor importancia hasta el momento. De esta manera, se quiere comprobar si la información referente a la estructura química de las moléculas y la energía es suficiente para describir el coeficiente de retención de los HAPs.

Descriptores: a_{nc} , $n_{anillo6}$ y $PM3_HOMO$.

Ecuación:

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| $\log k' = 1,99326$ $+0,05773 \cdot a_{nC}$ $-0,04593 \cdot n_{anillo6}$ $+0,19163 \cdot PM3_HOMO$ | Importancia relativa / % |
| | 66,49 |
| | 17,10 |
| | 16,41 |

Representación de los datos [Figura 51]:

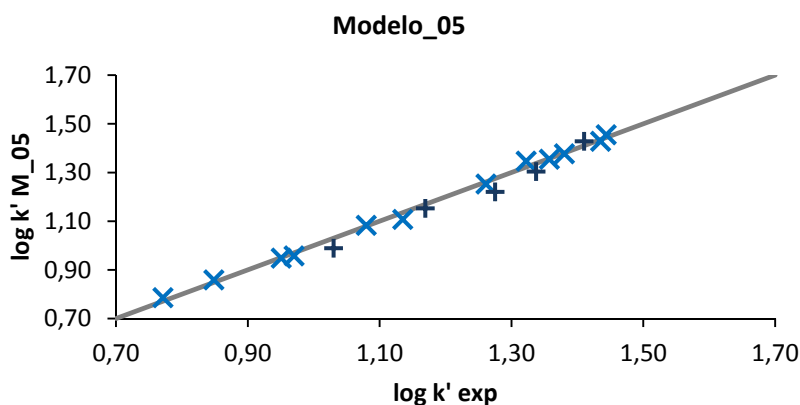


Figura 51. Comparación del valor de $\log k'$ que se ha predicho con el Modelo_05, respecto del valor experimental para el conjunto de entrenamiento (X, $R^2=0,997$, $RMSE=0,013$) y de validación (+, $R^2=0,978$, $RMSE = 0,036$)

Resultados:

Los resultados obtenidos con el Modelo_05 son idénticos a los obtenidos con el Modelo_04, pero este tiene la ventaja que trabaja con sólo tres descriptores. Con este resultado, se puede concluir que no se precisa la información sobre la hidrofobicidad de la molécula para describir el coeficiente de retención de los HAPs.

Modelo_06.

El último modelo que se presenta es el Modelo_06 que ha sido diseñado únicamente con descriptores tipo 2D.

Después de realizar varios ensayos con los descriptores y los modelos anteriores, se ha observado que los descriptores 3D presentan una cierta variabilidad debido a ligeras variaciones en la geometría de los HAPs cuando se ajusta la conformación de mínima energía. Sobre dos estructuras moleculares con diferente conformación, los descriptores 2D siempre dan el mismo valor, mientras que con los descriptores 3D los valores de los descriptores pueden variar ligeramente. Esta variación se puede considerar despreciable para alguno de los descriptores como es el caso del *PM3_HOMO*, utilizado en el Modelo_04, debido, seguramente, a la rigidez estructural de los HAPs.

Aun así, se ha creído oportuno estudiar un modelo en el que sólo intervengan descriptores tipo 2D, aunque parece poco probable que se obtengan resultados tan satisfactorios como los obtenidos en el Modelo_04 y el Modelo_05, ya que eliminando los descriptores 3D se pierde la información espacial de la molécula.

La metodología utilizada para seleccionar los descriptores, en este caso, es la misma que se utiliza en el Modelo_04, es decir, se seleccionan mediante AG. Se introducen todos los descriptores 2D disponibles en el programario MOE 2010, y se establece como limitación una combinación de entre tres y seis descriptores.

Descriptores: *BCUT_SMR_3, KierA1, PEOE_RPC(-), Q_RPC(-) y vdw_area.*

Ecuación:

| | |
|------------------------------|---------------------------------|
| log k' = 0,35959 | Importancia relativa / % |
| -0,03867 · BCUT_SMR_3 | 0,79 |
| +0,18659 · KierA1 | 81,25 |
| -0,00946 · PEOE_RPC- | 0,05 |
| -0,01739 · Q_RPC- | 0,10 |
| -0,00192 · vdw_area | 17,81 |

Representación de los datos [Figura 52]:

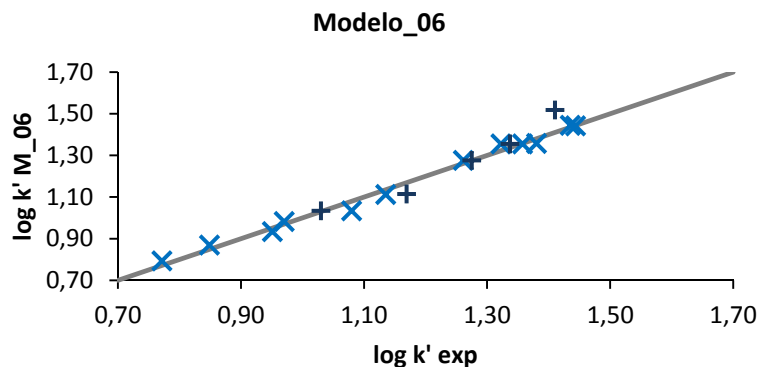


Figura 52. Comparación del valor de $\log k'$ que se ha predicho con el Modelo_06, respecto del valor experimental para el conjunto de entrenamiento (X, $R^2=0,991$, $RMSE=0,022$) y de validación (+, $R^2=0,947$, $RMSE = 0,055$)

Resultados:

Aunque el Modelo_06 supera el criterio de aceptación fijado, tanto para el conjunto de entrenamiento como en el de validación, la falta de descriptores 3D tiene un gran efecto en la descripción del coeficiente de retención. Las moléculas más pesadas son las que se ven más perjudicadas, siendo incapaz de discernir entre isómeros BaA (9) y Cry (10), B_jF-B_bF-B_kF-BaP (11 a 14), BghiP (16) y IP (17). Además, predice con una desviación muy elevada, el $\log k'$ de DiBahA (15).

3.3.2. Discusión de los resultados obtenidos para los diferentes modelos QSRR. Elección del modelo de predicción.

En la [Tabla 76], se presenta en forma de resumen, los seis modelos ensayados con sus descriptores además de los coeficientes R^2 y los errores cuadráticos medios (RMSE) que se obtienen tanto para el grupo de entrenamiento como para el de validación.

Tabla 76. Resumen de los modelos QSRR ensayados con los descriptores utilizados en cada caso ordenados en función de su importancia en cada uno de los ajustes además del porcentaje que ocupan (%) y su cantidad (n), y los coeficientes R^2 y los errores cuadráticos medios, tanto para las moléculas del grupo de entrenamiento como del de validación.

| Modelos | Descriptores | | | Grupo entrenamiento | | Grupo Validación | |
|-----------------|-------------------------|---------|---|---------------------|-------|------------------|-------|
| | Descripción | % | n | R^2 (*) | RMSE | R^2 (*) | RMSE |
| Modelo_1 | a_nC - n_anillo6, | 58 - 13 | 8 | 0,997 | 0,012 | 0,973 | 0,038 |
| | Kier1 - PM3_HOMO | 10 - 9 | | | | | |
| | E - PM3_LUMO | 6 - 1 | | | | | |
| | BCUT_SMR_0 - glob | < 1 | | | | | |
| Modelo_2 | a_nC - logP | 52 - 29 | 4 | 0,989 | 0,023 | 0,950 | 0,049 |
| | PEOE_VSA_HYD | 18 | | | | | |
| | PM3_dipole | 2 | | | | | |
| Modelo_3 | a_nC | 57 | 3 | 0,985 | 0,028 | 0,949 | 0,052 |
| | PEOE_VSA_HYD | 40 | | | | | |
| | PM3_dipole | 3 | | | | | |
| Modelo_4 | a_nC | 66 | 4 | 0,997 | 0,013 | 0,978 | 0,035 |
| | n_anillo6 - PM3_HOMO | 17 - 16 | | | | | |
| | PEOE_VSA_HYD | < 1 | | | | | |
| Modelo_5 | a_nC | 66 | 3 | 0,997 | 0,013 | 0,978 | 0,036 |
| | n_anillo6 - PM3_HOMO | 17 - 16 | | | | | |
| Modelo_6 | KierA1 | 81 | 5 | 0,991 | 0,012 | 0,947 | 0,055 |
| | vdw_area | 18 | | | | | |
| | BCUT_SMR_3 - PEOE_RPC-, | < 1 | | | | | |
| | Q_RPC-, | < 1 | | | | | |

(*) Criterio de aceptación: $R^2 > 0,95$

Si se observan los valores los valores que se presentan en la [Tabla 76], todos los modelos descritos presentan un ajuste satisfactorio respecto al conjunto de moléculas de entrenamiento, teniendo valores de R^2 superiores al criterio de aceptación establecido ($R^2 > 0,95$). Igual sucede con la predicción, indicando que los descriptores seleccionados son útiles para definir las estructuras químicas de los HAPs y sus interacciones con el sistema cromatográfico, marcando sus tiempos de retención.

Aunque es importante considerar la tendencia que presentan las predicciones. Todos los modelos propuestos se ajustan correctamente a una recta, pero si se estudian más detalladamente los valores de $\log k'$ que asignan los modelos a las moléculas, se observa que aquellas que se encuentran en los extremos del cromatograma presentan mayores desviaciones. Este hecho podría explicarse debido a que las moléculas de los extremos del conjunto de validación se encuentran menos representadas en el conjunto de entrenamiento, hecho que se traduce en un mayor error.

Estudiando el efecto de los descriptores sobre los modelos, se comprueba que el descriptor que corresponde al número de átomos de carbono (a_nC) es el que presenta una mayor contribución en la ecuación del coeficiente de retención ($\log k'$) en todos los modelos en los que aparece. Éste no sólo es importante por el valor que proporcionan sino también por la información química que hace referencia. Cabe destacar, que según ensayos realizados, se ha demostrado que su sustitución por otro descriptor molecular que represente la misma información, como la masa molecular, no supone ningún efecto sobre el modelo de predicción. Sin embargo, es importante destacar que este descriptor no es capaz de diferenciar isómeros, por lo que es necesario complementarlo con otros descriptores que hagan mejorar su capacidad de predicción.

Entrando a discutir los modelos para poder seleccionar el que mejor representa cómo se separan los HAPs dentro del sistema de cromatografía líquida, llevada a cabo con una columna específica para la separación de esta familia de compuestos (Pursuit HAP (100 X 4,6 mm; 3 μ m)):

- Se excluyen los tres primeros modelos debido al número excesivo de descriptores (Modelo_1) y a los valores de R^2 (Modelo_2 y Modelo_3).

Como se ha comentado, un modelo adecuado es aquel que no sólo proporciona un buen ajuste sino que lo hace con el mínimo número de descriptores posibles. Aunque si tenemos en cuenta únicamente los resultados del ajuste, el Modelo_1 es el que presenta mejores resultados. Pero como éste modelo se describe con un total de 8 descriptores, hace que el número de variables a considerar sea demasiado elevado teniendo en cuenta el total de moléculas disponibles en el conjunto de entrenamiento (12). Sin embargo, si se tiene en cuenta la proporción de los descriptores que describen dicho modelo, el 90% del ajuste viene definido por sólo cuatro de los ocho descriptores (a_{nc} , n_{anell6} , $PM3_HOMO$ i $kier1$).

El Modelo_2 y el Modelo_3, han quedado descartados porque aunque los valores del ajuste cumplen con los criterios de aceptación, si se comparan con los otros modelos, sus valores de R^2 son menores. Ambos modelos son muy parecidos en lo que hace referencia a los descriptores que se utilizan en el ajuste, la única diferencia es que el Modelo_2 incluye el $logP$ (como segundo descriptor en importancia relativa) mientras que el Modelo_3 no lo incluye. En el Modelo_3 la información del $logP$, el cual ofrece una información de hidrofobicidad en la descripción del $logK'$, se ve compensada por el aumento de la contribución del $PEOE_VSA_HYD$, descriptor que también aporta este tipo de información. Con esto se demuestra que ambos descriptores son independientes, es decir, que funcionan de manera individual y su combinación no aporta mejoras en el ajuste ni en la predicción del modelo QSRR

- Se descarta también el Modelo_6, modelo definido únicamente con descriptores de tipo 2D, ya que los valores de R^2 obtenidos aunque son aceptables (0,991-conjunto de entrenamiento; 0,947 – conjunto de validación) su capacidad de predicción empeora mucho respecto a aquellos modelos que incluyen también descriptores 3D. Esto demuestra que la visión espacial que ofrecen los descriptores 3D es un factor importante a tener en cuenta a la hora de describir la retención de los analitos a estudio en el sistema cromatográfico.

Así, la selección del modelo de predicción para describir la retención de los HAPs en el sistema cromatográfico de HPLC propuesto, se escoge entre el Modelo 4 y el Modelo_5. El Modelo_4 incluye cuatro descriptores a_{nc} , n_{anell6} , $PM3_HOMO$ y $PEOE_VSA_HYD$, que aportan información sobre la estructura química, la energía y la hidrofobicidad de las moléculas. Aunque esta última propiedad, incluida en el descriptor $PEOE_VSA_HYD$, tiene muy poca representación

(< 1%) en la expresión del $\log k'$. El Modelo_5 omite el descriptor de hidrofobicidad, y describe el coeficiente de retención con un número muy bajo de descriptores, tan solo tres y, además, el ajuste que ofrece no se ve alterado por esta modificación.

Otro punto importante que presenta el Modelo_5 es que los descriptores que utiliza (a_{nc} , n_{anell6} y $PM3_HOMO$), son junto con el $kier1$, los descriptores con mayor contribución en el Modelo_1.

Así, el **Modelo_5** es el modelo QSRR de predicción escogido para estudiar y definir la separación de los 17 HAPs por HPLC, con una columna tipo Pursuit HAP, que incluye una fase estacionaria de sílice funcionalizada poliméricamente con grupos C18 y una fase móvil formada por agua y acetonitrilo en modo gradiente. Este modelo incluye tres descriptores estructurales. Dos de ellos (a_{nc} y n_{anell6}) que son los que se encuentran en mayor importancia relativa en el ajuste (66% y 17%, respectivamente), están relacionados con el volumen molecular y hacen referencia a interacciones intermoleculares no específicas, dispersivas con los ligandos de la fase estacionaria. Sin embargo estos dos descriptores no son capaces de diferenciar isómeros, para ello, se necesita un tercer descriptor. Éste corresponde con un descriptor estructural que está relacionado con la energía de la molécula. Corresponde con la energía del HOMO (*Highest occupied molecular orbital*), representada con el descriptor **PM3_HOMO**, que se relaciona con la energía del orbital molecular más alto ocupado. Este descriptor tiene especial interés en los estudios QSRR en los que se espera que las interacciones intermoleculares del par de electrones deslocalizados (dador-aceptor) sean decisivas para la retención. Así, esta propiedad de tipo energético definida con un cálculo de química cuántica es capaz de diferenciar y ajustar los coeficientes de retención de los diferentes isómeros.

Por lo tanto, todos los descriptores hacen referencia a la propia molécula y no tienen en consideración ningún tipo de interacción externa, como podría ser la hidrofobicidad del entorno. Este hecho hace pensar que el tamaño de las moléculas es el principal factor que gobierna el mecanismo de separación de los HAPs, y no necesita considerar la interacción directa con el sistema cromatográfico.

3.4. EFICACIA DEL MODELO QSRR.

Una vez obtenido el modelo QSRR, es importante evaluar su capacidad de predicción de tiempos de retención, tanto de las moléculas que han formado parte bien del grupo de entrenamiento como del grupo de validación, así como de otros HAPs de los que se conoce su estructura química pero no se dispone de patrón, por lo que se desconoce su comportamiento cromatográfico.

3.4.1. Modelo QSRR de predicción. Aplicación.

Después del estudio de los diferentes modelos QSRR propuestos, se escoge el Modelo_5 como modelo QSRR de predicción para el estudio de la relación estructura-retención cromatográfica de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, en el sistema cromatográfico propuesto.

Este modelo se describe en la [Ecuación 11]:

$$\log k' = 1,99326 + 0,05773 \cdot a_{nC} - 0,04593 \cdot n_{anell6} + 0,19163 \cdot PM3_HOMO$$

Ecuación 11. Ecuación correspondiente al modelo QSRR que describe la relación estructura-retención cromatográfica de los HAPs por HPLC.

En la [Tabla 77], se presentan los tiempos de retención experimentales de los analitos a estudio (tanto del grupo de entrenamiento como de validación) que corresponden a un valor promedio de diez inyecciones realizadas, junto con sus respectivos valores de $\log k'$. Además, se incluyen los coeficientes de retención obtenidos por predicción a partir del modelo QSRR y su tiempo de retención, utilizando como volumen muerto 0,662 (calculado en el apartado 2.2 del Capítulo II; página 156). Para comparar los resultados experimentales y los resultados obtenidos por predicción, se incluyen los valores residuales, expresados en porcentaje, entre ambos tiempos de retención.

Tabla 77. Tiempos de retención de los analitos de estudio, valores de $\log k'$ experimentales y predichos con el modelo QSRR y valores residuales.

| Compuesto (HAP) | tr_{exp} (min) | $\log k'_{exp}$ | $\log k'_{pred}$ | tr_{pred} (min) | Residual** (%) |
|-----------------------------|------------------|-----------------|------------------|-------------------|----------------|
| 01-Naftaleno | 4,572 | 0,771 | 0,785 | 4,702 | 2,8 |
| 02-Acenaftileno | 5,333 | 0,849 | 0,859 | 5,446 | 2,1 |
| 03-Acenafteno | 6,573 | 0,951 | 0,948 | 6,538 | -0,5 |
| 04-Fluoreno | 6,843 | 0,970 | 0,958 | 6,667 | -2,6 |
| 05-Fenantreno (*) | 7,755 | 1,030 | 0,989 | 7,112 | -8,3 |
| 06-Antraceno | 8,615 | 1,080 | 1,083 | 8,678 | 0,7 |
| 07-Fluoranteno | 9,695 | 1,135 | 1,107 | 9,137 | -5,8 |
| 08-Pireno (*) | 10,436 | 1,169 | 1,152 | 10,064 | -3,6 |
| 09-Benzo(a)antraceno | 12,742 | 1,261 | 1,253 | 12,524 | -1,7 |
| 10-Criseno (*) | 13,133 | 1,275 | 1,221 | 11,666 | -11,2 |
| 11-Benzo(j)fluoranteno | 14,566 | 1,322 | 1,347 | 15,380 | 5,6 |
| 12-Benzo(b)fluoranteno (*) | 15,056 | 1,337 | 1,304 | 14,000 | -7,0 |
| 13-Benzo(k)fluoranteno | 15,742 | 1,358 | 1,355 | 15,652 | -0,6 |
| 14-Benzo(a)pireno | 16,549 | 1,380 | 1,377 | 16,439 | -0,7 |
| 15-Dibenzo(ah)antraceno (*) | 17,686 | 1,410 | 1,429 | 18,420 | 4,1 |
| 16-Benzo(ghi)perileno | 18,691 | 1,435 | 1,428 | 18,391 | -1,6 |
| 17-Indeno(123-cd)pireno | 19,053 | 1,444 | 1,455 | 19,542 | 2,6 |

(*) Compuestos del conjunto de validación, marcados en color naranja (**). Residual (%)¹⁹

¹⁹ El valor residual (%) se ha calculado como la diferencia entre los tiempos de retención (PRED-EXP) normalizado por el tiempo de retención experimental, expresado en porcentaje.

En la [Figura 53] se representan los valores residuales (%) calculados a partir de los tiempos de retención experimentales y predichos a partir del modelo QSRR, de los 17 HAPs a estudio (incluye tanto las moléculas correspondientes al grupo de entrenamiento y de validación).



Figura 53. Gráfico de residuales (%) de los 17 HAPs a estudio, calculados a partir de la relación entre el tiempo de retención experimental y el obtenido por predicción del modelo QSRR. En azul, se marcan los valores correspondientes a las moléculas del grupo de entrenamiento, y en naranja las del grupo de validación.

En la [Figura 53] se observa una cierta aleatoriedad de los valores residuales, pero los valores máximos corresponden a tres de las moléculas del grupo de validación (fenantreno, criseno y benzo(b)fluoranteno), siendo el máximo el del criseno con un -11%.

También es importante destacar el orden de elución. Hasta el pireno, el orden de elución no se ve alterado, pero a partir de éste, tres parejas de compuestos alteran su orden de elución si se comparan los valores experimentales y los obtenidos por predicción con el modelo QSRR: BaA-Cry, BfF-BbF y DiBahA-BghiP. En los tres casos, se trata de parejas de isómeros que, además uno de los compuestos forma parte del grupo de entrenamiento y el otro en el grupo de validación, los cuales, como se ha mencionado anteriormente, presenta predicciones de los valores de tiempo de retención más alejados de los valores experimentales.

Este cambio en el orden de elución también podría ser provocado por la separación cromatográfica. Las moléculas más pequeñas, que se eluyen en la primera parte del cromatograma antes del pico del pireno, son más diferentes entre ellas y cromatográficamente quedan mejor separadas y representadas en el modelo. En cambio, las moléculas de mayor masa molecular se eluyen más juntas, ya que químicamente son más parecidas o incluso son isómeros.

3.4.2. Estudio de posibles candidatos

Además de describir de forma teórica la relación entre la estructura de las moléculas y su retención en el sistema cromatográfico a estudio, otra de las posibles aplicaciones de los modelos QSRR es predecir el tiempo de retención de picos desconocidos que aparecen en el cromatograma. Para poder aplicar el modelo QSRR es necesario que estos picos desconocidos pertenezcan a la misma familia de compuestos para la que se ha descrito el modelo de predicción y tengan una estructura química conocida, es decir, se debe proponer un posible candidato.

Se proponen diez posibles candidatos para predecir su tiempo de retención. Seis de ellos ya han sido estudiados en el primer capítulo de la presente tesis, por lo que se conoce su orden de elución (ciclopenta(cd)pireno, benzo(e)pireno y los cuatro isómeros del dibenzopireno). El resto, son compuestos que pueden estar presentes en muestras de inmisiones atmosféricas como benzo(ghi)fluoreno, perileno, trifenileno y piceno.

La estructura molecular de los cuatro compuestos ya conocidos, se presentan en la [Tabla 3] mientras que las de los nuevos compuestos se presentan en la [Figura 54].

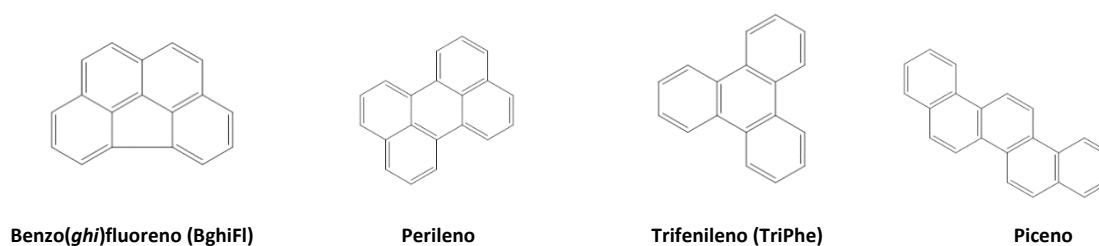


Figura 54. Estructura química de los hidrocarburos aromáticos candidatos, no estudiados hasta el momento.

En la [Tabla 78], se presentan los valores de los descriptores de los nuevos compuestos, que permitirán calcular el coeficiente de retención predicho a partir del modelo QSRR.

Tabla 78. Valores de los descriptores moleculares correspondientes a los nuevos compuestos propuestos como candidatos.

| Nombre | a_nC | n_anell6 | PM3_HOMO |
|----------------------|------|----------|----------|
| Ciclopenta(cd)pireno | 18 | 4 | -8,372 |
| Benzo(ghi)fluoreno | 18 | 4 | -8,773 |
| Trifenileno | 18 | 4 | -8,771 |
| Benzo(e)pireno | 20 | 5 | -8,335 |
| Perileno | 20 | 5 | -7,987 |
| Piceno | 22 | 5 | -8,478 |
| Dibenzo(al)pireno | 24 | 6 | -8,079 |
| Dibenzo(ae)pireno | 24 | 6 | -8,140 |
| Dibenzo(ai)pireno | 24 | 6 | -7,987 |
| Dibenzo(ah)pireno | 24 | 6 | -7,808 |

En naranja se marcan los compuestos de los que no se conoce su orden de elución

En la [Tabla 79], se presentan los coeficientes de retención ($\log k'$) y los tiempos de retención, ambos obtenidos de la aplicación del modelo QSRR propuesto. En este caso, los compuestos se han ordenado en función del número de carbonos.

Tabla 79. Coeficiente de retención y tiempos de retención de los candidatos, obtenidos a partir del modelo QSRR.

| Compuesto (HAP) | a_nC | $\log k'_{\text{PRED}}$ | tr_{PRED} (min) |
|----------------------|------|-------------------------|--------------------------|
| Ciclopenta(cd)pireno | 18 | 1,244 | 12,28 |
| Benzo(ghi)fluoreno | 18 | 1,167 | 10,40 |
| Trifenileno | 18 | 1,168 | 10,41 |
| Benzo(e)pireno | 20 | 1,321 | 14,53 |
| Perileno | 20 | 1,388 | 16,82 |
| Piceno | 22 | 1,409 | 17,64 |
| Dibenzo(al)pireno | 24 | 1,543 | 23,79 |
| Dibenzo(ae)pireno | 24 | 1,555 | 24,42 |
| Dibenzo(ai)pireno | 24 | 1,573 | 25,41 |
| Dibenzo(ah)pireno | 24 | 1,607 | 27,45 |

Los tres candidatos con 18 carbonos en su estructura (ciclopenta(cd)pireno, benzo(ghi)fluoreno y trifenileno), les corresponde un tiempo de retención obtenido por predicción de 12,28 min, 10,40 min y 10,41 min, respectivamente. El ciclopenta(cd)pireno, según la predicción, se eluye justo delante del benzo(a)antraceno al que le corresponde un tiempo de retención de 12,74 min. Este resultado se corresponde con el que se obtiene experimentalmente. El benzo(ghi)perileno y el trifenileno, según la predicción se eluyen en la zona del pireno (10,44 min), parece que ligeramente delante. Cabe destacar, que el pireno tiene 16 átomos de carbono en su estructura y tres anillos tipo benceno. Realmente, es de esperar que el benzo(ghi)fluoreno se eluya antes del trifenileno, y ambos se posicionen en el cromatograma en la zona del criseno.

El benzo(e)pireno, según la predicción le corresponde un tiempo de retención de 14,53 min, por lo que le corresponde una elución junto al B_jF, delante del B_bF. Este resultado coincide con lo que se ha obtenido experimentalmente en el primer capítulo de la presente tesis.

El perileno, con también 20 átomos de carbono en su estructura, le corresponde un tiempo de retención por predicción de 16,82 min por lo que se eluiría justo después del benzo(a)pireno. Mientras que el piceno con 22 átomos de carbono, al que le corresponde un tiempo de retención obtenido por predicción de 17,64 min, se eluiría justo antes del dibenzo(ah)antraceno. Estos dos resultados parecen totalmente lógicos y esperables.

De los cuatro isómeros del dibenzopireno, el modelo QSRR es capaz de predecir correctamente su orden de elución pero los tiempos de retención pueden tener demasiado error, ya que tanto en el número de anillos de 6 como en el número de carbonos superan al IP. De manera que se está realizando una extrapolación al modelo.

En conclusión, el modelo QSRR desarrollado en este trabajo, parece adecuado para predecir los tiempos de retención tanto de las moléculas que forman el grupo de entrenamiento como de validación (con un error máximo del 11%). Además, parece que es capaz de devolver valores de tiempos de retención aceptables de moléculas sin identificar en el modelo pero con estructura química conocida, tal y como se ha demostrado en moléculas de la misma familia no incluidas en el modelo pero de las que se conoce su orden de elución. Sin embargo, los puntos más discutibles del modelo serían:

- Que no es capaz de predecir adecuadamente tiempos de retención de moléculas por extrapolación (cosa totalmente esperable)
- El error de ajuste del modelo puede provocar que moléculas de elución cercana puedan alterar su orden de elución.

Por esta razón, queda claro que el modelo permite, tanto conocer los principios de separación de las moléculas de una misma familia en un determinado sistema cromatográfico como dar una idea adecuada de los tiempos de retención estos compuestos. Sin embargo, para corroborar el tiempo predicho es indispensable inyectar un patrón del analito en las condiciones cromatográficas con las que se ha realizado el modelo QSRR.

3.5. ROBUSTEZ DEL MODELO QSRR

Con la finalidad de conocer la robustez del modelo QSRR, se propone realizar diferentes cambios en el sistema cromatográfico y estudiar cómo afecta al modelo propuesto.

Así, se propone realizar cambios en:

- Las condiciones cromatográficas. Aplicación a diferentes gradientes de elución.
- La técnica cromatográfica. Aplicación a una separación por cromatografía de gases.

- Las dimensiones de la columna y sistema cromatográfico: Aplicación a una separación por UHPLC.
- En la familia de compuestos: Aplicación a un grupo de derivados de los HAPs (nitro-HAPs).

A continuación se desarrollan cada uno de los cambios realizados en el modelo.

3.5.1. Cambios en las condiciones cromatográficas de HPLC (gradiente de elución)

Se quiere estudiar qué efecto tiene sobre la predicción del modelo el cambio de las condiciones cromatográficas, realizadas sobre el mismo sistema de HPLC, es decir, se quiere comprobar si el modelo es capaz de adaptarse y seguir el gradiente de elución.

Se propone trabajar con el mismo sistema cromatográfico, la misma columna (Pursuit 3PAH (100 x 4,6 mm; 3 µm)), la misma temperatura (33°C), el mismo flujo (1,2 mL/min) y los mismos componentes en la fase móvil (agua MilliQ y acetonitrilo). Pero se propone ensayar tres gradientes diferentes de elución, uno de ellos es el que se ha utilizado para ajustar el modelo.

En la [Tabla 80], se presentan los tres gradientes ensayados.

Tabla 80. Especificación de los gradientes de elución ensayados. Estudio robustez del modelo QSRR en referencia a las condiciones cromatográficas.

| Etapas gradiente | GRADIENTE 1 | GRADIENTE 0 [MODELO QSRR] | GRADIENTE 2 |
|------------------------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | <i>Rápido</i> | <i>Medio</i> | <i>Lento</i> |
| 1 | 0,00 min: 50% B | 0,00 min: 50% B | 0,00 min: 50% B |
| 2 | 7,00 min: 65% B | 7,00 min: 65% B | 7,00 min: 65% B |
| 3 | --- | 15,00 min: 90% B | 16,00 min: 75% B |
| 4 | 13,00 min: 100% B | 25,00 min: 100% B | 28,00 min: 100% B |
| 5 | 18,00 min: 100% B | 26,00 min: 100% B | 30,00 min: 100% B |
| 6 (estabilización condiciones iniciales) | 19,00 min: 50% B | 30,00 min: 50% B | 32,00 min: 50% B |

En la [Figura 55], en la [Figura 56] y en la [Figura 57] se presenta un cromatograma ejemplo de los 16 EPA-HAP con B_jF preparado en acetonitrilo en cada uno de los tres gradientes propuestos. En todos los casos, la disolución patrón inyectada, incluye cromato de potasio como marcador del tiempo muerto, que corresponde al primer pico que aparece en el cromatograma. En las tres figuras, se incluye el perfil del gradiente tal y como se programa en el método, sin considerar el retraso del volumen muerto del sistema. En todos los casos sería equivalente a 0,72 mL (tiempo muerto ≈ 0,6 min).

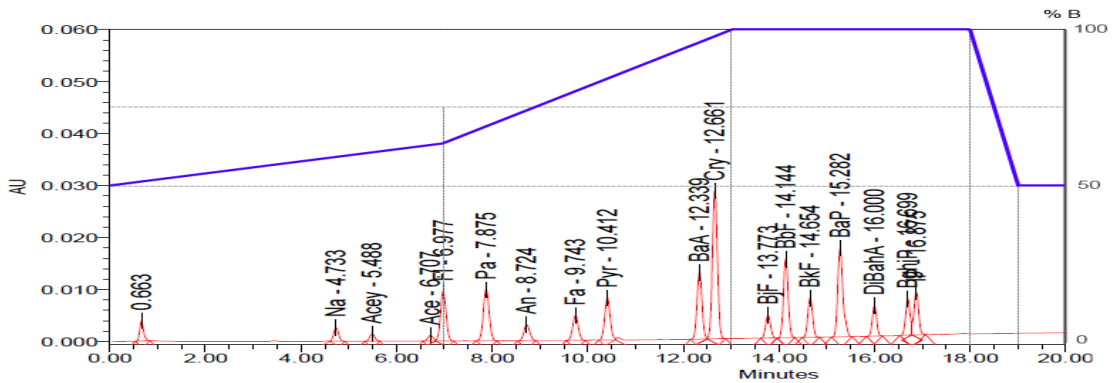


Figura 55. Cromatograma obtenido al analizar un patrón de 17 HAPs (16 EPA-HAPs y BfF) con el método cromatográfico correspondiente al GRADIENTE 1 (rápido). En cada señal se marca la identificación del HAP correspondiente con su tiempo de retención. En azul, se presenta el porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil a lo largo del GRADIENTE 1.

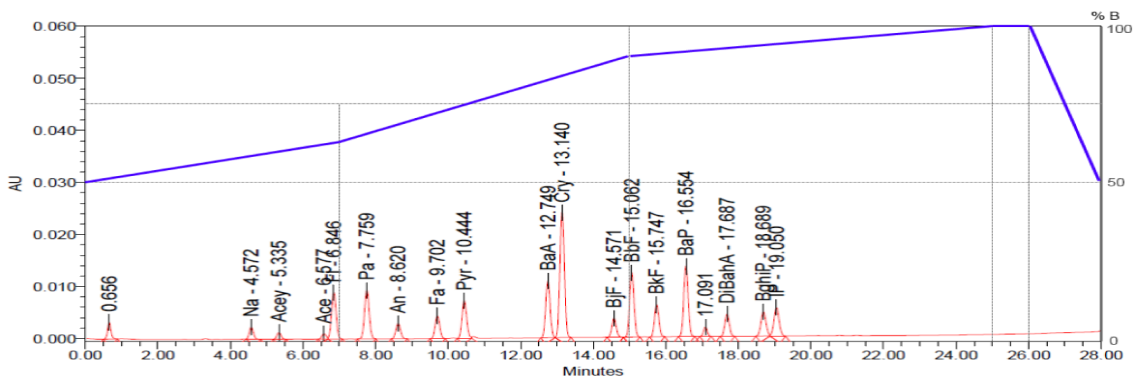


Figura 56. Cromatograma obtenido al analizar un patrón de 17 HAPs (16 EPA-HAPs y BfF) con el método cromatográfico correspondiente al GRADIENTE 0 (correspondiente al MODELO QSRR). En cada señal se marca la identificación del HAP correspondiente con su tiempo de retención. En azul, se presenta el porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil a lo largo del GRADIENTE 0 (correspondiente al MODELO QSRR).

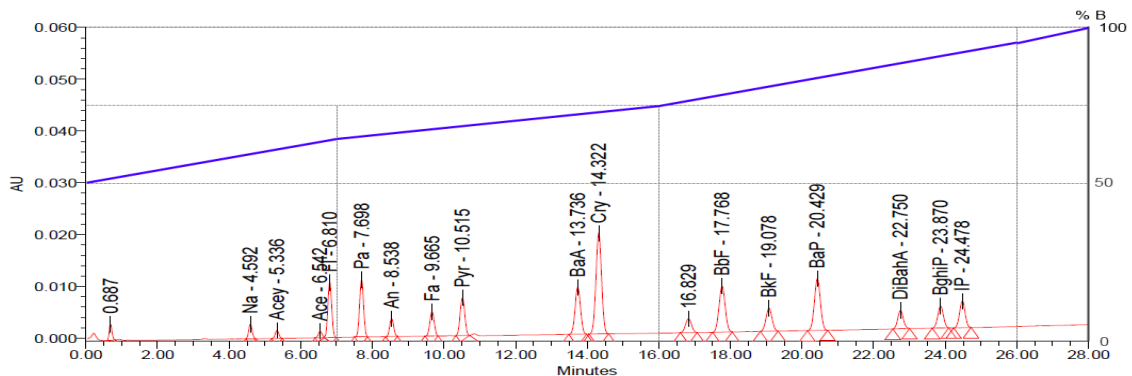


Figura 57. Cromatograma obtenido al analizar un patrón de 17 HAPs (16 EPA-HAPs y BfF) con el método cromatográfico correspondiente al GRADIENTE 2 (lento). En cada señal se marca la identificación del HAP correspondiente con su tiempo de retención. En azul, se presenta el porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil a lo largo del GRADIENTE 2 (lento).

La principal diferencia entre los cromatogramas obtenidos es el tiempo de elución. Mientras que en el primer método los compuestos se eluyen en 17 minutos, en el segundo lo hacen en 20 minutos y en el tercero en 25 minutos. Este retardo en el tiempo de retención, se traduce en una mejor separación de los compuestos, especialmente, los que se eluyen a final del cromatograma. Así, si se considera la pareja BghiP-IP, en los dos primeros métodos, estos compuestos se encuentran separados 0,18 y 0,36 min, respectivamente. Mientras que en el último de los gradientes propuestos (*Gradiente 2 (lento)*), la diferencia aumenta hasta 0,61 min.

En la [Tabla 81], se presentan los valores de tiempos de retención y $\log k'$, obtenidos con cada uno de los gradientes. La adquisición de los datos de los tiempos de retención se realiza inyectando diez veces la disolución patrón de HAPs que contiene el marcador del tiempo muerto, disuelto en agua/acetoneitrilo (30:70).

Tabla 81. Tiempos de retención de los analitos de estudio y valores de $\log k'$ experimentales para buscar los modelos QSRR en función del cambio de gradiente de elución (Gradiente 1 (rápido) – Gradiente 0 (de referencia equivalente al modelo QSRR) – Gradiente 2 (lento))

| Compuesto (HAP) | GRADIENTE 1 (rápido) | | GRADIENTE 0 (ref.: Modelo QSRR) | | GRADIENTE 2 (lento) | |
|-----------------------------|-------------------------|-----------------|------------------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|
| | tr_{exp} (min) | $\log k'_{exp}$ | tr_{exp} (min) | $\log k'_{exp}$ | tr_{exp} (min) | $\log k'_{exp}$ |
| 01-Naftaleno | 4,574 | 0,809 | 4,572 | 0,771 | 4,609 | 0,809 |
| 02-Acenaftileno | 5,317 | 0,883 | 5,333 | 0,849 | 5,354 | 0,883 |
| 03-Acenafteno | 6,516 | 0,982 | 6,573 | 0,951 | 6,557 | 0,982 |
| 04-Fluoreno | 6,784 | 1,001 | 6,843 | 0,970 | 6,822 | 1,001 |
| 05-Fenantreno (*) | 7,668 | 1,059 | 7,755 | 1,030 | 7,706 | 1,059 |
| 06-Antraceno | 8,504 | 1,108 | 8,615 | 1,080 | 8,541 | 1,107 |
| 07-Fluoranteno | 9,523 | 1,161 | 9,695 | 1,135 | 9,665 | 1,165 |
| 08-Pireno (*) | 10,193 | 1,192 | 10,436 | 1,169 | 10,517 | 1,204 |
| 09-Benzo(a)antraceno | 12,140 | 1,273 | 12,742 | 1,261 | 13,730 | 1,326 |
| 10-Criseno (*) | 12,460 | 1,285 | 13,133 | 1,275 | 14,314 | 1,345 |
| 11-Benzo(j)fluoranteno | 13,578 | 1,324 | 14,566 | 1,322 | 16,810 | 1,417 |
| 12-Benzo(b)fluoranteno (*) | 13,950 | 1,336 | 15,056 | 1,337 | 17,748 | 1,442 |
| 13-Benzo(k)fluoranteno | 14,462 | 1,352 | 15,742 | 1,258 | 19,056 | 1,474 |
| 14-Benzo(a)pireno | 15,085 | 1,372 | 16,549 | 1,380 | 20,412 | 1,505 |
| 15-Dibenzo(ah)antraceno (*) | 15,819 | 1,393 | 17,686 | 1,410 | 22,726 | 1,553 |
| 16-Benzo(ghi)perileno | 16,504 | 1,412 | 18,691 | 1,435 | 23,854 | 1,574 |
| 17-Indeno(123-cd)pireno | 16,680 | 1,417 | 19,053 | 1,444 | 24,450 | 1,585 |

(*) Conjunto de validación

Una vez obtenidos los datos cromatográficos, se procede a estudiar la adaptación del modelo QSRR desarrollado sobre los nuevos gradientes. Para ello, se introducen los valores del $\log k'_{exp}$ obtenidos en cada uno de los casos a la quimioteca virtual y, sobre las moléculas del conjunto de entrenamiento, se generan dos nuevos modelos con los descriptores del modelo QSRR propuesto (a_{nC} , n_{anell6} y $PM3_HOMO$). Posteriormente, estos nuevos modelos se aplican al conjunto de moléculas de validación, sobre el que se estudia la capacidad de predicción del modelo.

En la [tabla 78], se presentan las ecuaciones de los tres modelos QSRR y la importancia relativa de cada uno de los descriptores para cada uno de los gradientes ensayados En la [Tabla 83], se incluyen los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos en los ajustes y los errores cuadráticos medios, tanto de las moléculas correspondientes al grupo de entrenamiento como de validación.

Tabla 82. Cambio de gradiente de elución: Ecuaciones de los tres modelos QSRR y la importancia relativa de cada uno de los descriptores, en cada uno de los gradientes a estudio. El Modelo QSRR correspondiente al GRADIENTE 0, equivale al modelo QSRR de referencia incluido en la [Ecuación 9].

| Modelo QSRR: GRADIENTE 1 (rápido) | |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------------|
| log k' = | 2,12173 |
| | Importancia relativa / % |
| +0,05492 · a_nC | 62,86 |
| -0,05456 · n_anillo6 | 20,19 |
| +0,19635 · PM3_HOMO | 16,95 |
| Modelo QSRR: GRADIENTE 0 (referencia) [Ecuación 9] | |
| log k' = | 1,9936 |
| | Importancia relativa / % |
| +0,05773 · a_nC | 66,49 |
| -0,04593 · n_anillo6 | 17,10 |
| +0,19163 · PM3_HOMO | 16,41 |
| Modelo QSRR: GRADIENTE 2 (lento) | |
| log k' = | 1,70470 |
| | Importancia relativa / % |
| +0,06167 · a_nC | 76,13 |
| -0,02141 · n_anillo6 | 8,55 |
| +0,16689 · PM3_HOMO | 15,32 |

Tabla 83. Resumen de los resultados de los modelos QSRR ensayados según los cambios en el gradiente de elución. Se incluyen los coeficientes R^2 y los errores cuadráticos medios, tanto para las moléculas del grupo de entrenamiento como del de validación.

| Modelos QSRR | Grupo entrenamiento | | Grupo Validación | |
|---------------------------------|---------------------|-------|------------------|-------|
| | R^2 (*) | RMSE | R^2 (*) | RMSE |
| GRADIENTE 1 (rápido) | 0,994 | 0,016 | 0,971 | 0,050 |
| GRADIENTE 0 (referencia) | 0,997 | 0,013 | 0,978 | 0,036 |
| GRADIENTE 2 (lento) | 0,997 | 0,015 | 0,983 | 0,025 |

(*) Criterio de aceptación: $R^2 > 0,95$

En la [Figura 58], se incluye la representación entre el $\log k'$ experimental ($\log k'_{exp}$) y el $\log k'$ obtenido por predicción ($\log k'_{pred}$), tanto de las moléculas correspondientes al grupo de entrenamiento como a las del grupo de validación, en los modelos QSRR obtenidos con el Gradiente 1 (rápido) y con el Gradiente 2 (lento). La representación correspondiente al método de referencia se incluye en la [Figura 51].

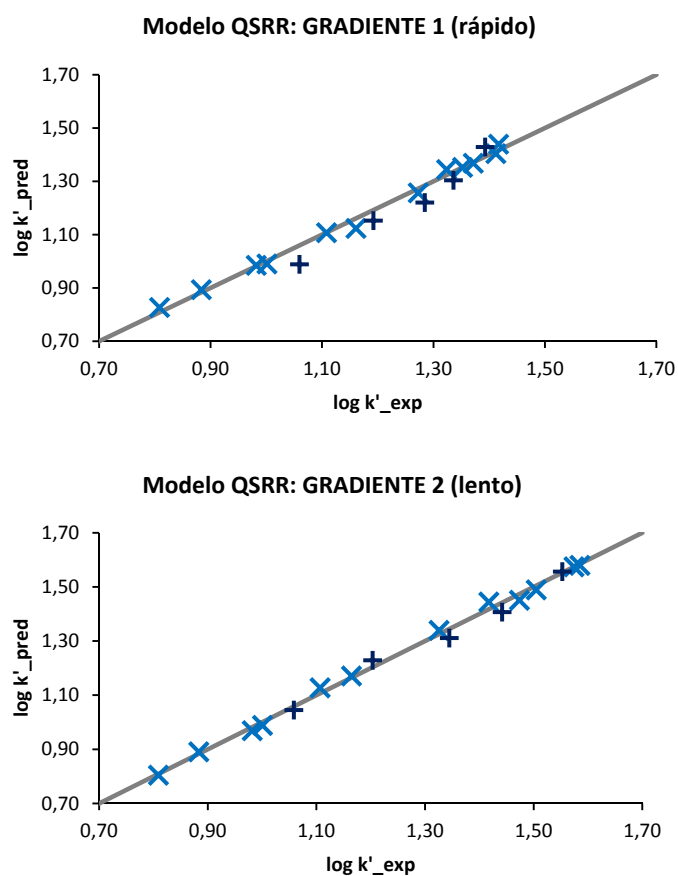


Figura 58. Comparación de los valores de $\log k'$ predichos con los modelos QSRR correspondientes a los Gradientes 1 (rápido) [superior] y 2 (lento) [inferior], respecto al valor experimental, tanto para el conjunto de entrenamiento (X) y de validación (+).

La primera conclusión que se extrae de analizar los valores que se muestran en la [Tabla 83], es que tanto el ajuste, como la capacidad de predicción de los modelos QSRR, mejoran a media que el gradiente retarda la elución de los compuestos. Al alargar el gradiente, los compuestos se eluyen más separados y la diferencia entre los tiempos de retención es mayor. Por lo tanto, la asignación de los tiempos de retención a los analitos es más precisa y, consecuentemente también mejora la capacidad de predicción.

De los resultados obtenidos, también se concluye que los descriptores empleados para desarrollar los tres modelos QSRR (número de átomos de carbono, número de anillos de seis miembros y la energía del orbital más alto ocupado), se adaptan a las condiciones del sistema cromatográfico utilizado. De manera que la adecuación de los descriptores seleccionados es independiente del gradiente de elución.

A pesar de la capacidad de adaptación a las condiciones cromatográficas por parte de los descriptores incluidos, su importancia relativa dentro de la expresión del $\log k'$ se modifica con

el cambio de gradiente. En los tres modelos, el descriptor con mayor contribución es el número de átomos de carbono (a_{nC}) y presenta una tendencia a aumentar su importancia, a medida que el gradiente retarda la elución de los compuestos. Este aumento en la contribución del descriptor a_{nC} se da en contra de una disminución de la importancia del número de anillos aromáticos de 6 miembros (n_{anell6}), hasta el punto, que en el último de los modelos presentados, este descriptor pasa a ser el de menor importancia, mientras que en los otros dos modelos lo es el PM3_HOMO. Este último descriptor, también presenta una disminución progresiva a medida que el gradiente se hace más lento.

3.5.2. Cambio en la técnica cromatográfica. Aplicación a la separación por HRGC.

Se propone evaluar la aplicabilidad del modelo QSRR de predicción desarrollado cuando se trabaja con cromatografía de gases.

En este caso, el equipo que se utiliza es un *Agilent 6890N* de *Agilent Technologies*, con detector de ionización de llama (FID).

El método cromatográfico es equivalente al puesto a punto por HRGC-MS [Tabla 45] para la separación de los 24 HAPs a estudio. Se propone trabajar con la columna de gases ultrarrápida VF17 MS for PAH (20 m X 0,15 mm X 0,05 μ m). Su fase estacionaria es de polaridad media (50% fenil-50% dimetilpolisiloxano) donde los grupos fenilos proporcionan una selectividad basada en las interacciones π/π , de manera que es posible separar isómeros, tal y como se ha comentado en el apartado de optimización de la separación por cromatografía de gases [página 85].

El programa de temperaturas propuesto es el siguiente: 60°C (1,80 min) – 50°C/min – 190°C - 5°C/min – 300°C (2,0 min).

En la [Tabla 84] se presentan los tiempos de retención de los 17 analitos (promedio de tres inyecciones), obtenidos con el sistema cromatográfico propuesto y los coeficientes de retención experimentales. Para el cálculo del $\log k'$, se utiliza como tiempo muerto la primera señal que aparece en el cromatograma que corresponde con el pico de disolvente y que tiene un valor de 0,932 min.

Tabla 84. Datos experimentales de los tiempos de retención y $\log k'$ para los analitos a estudio obtenidos al analizar el patrón de 17 HAPs por HRGC-FID, en las condiciones cromatográficas descritas. También se incluyen los incrementos de tiempo (Δtr) entre dos analitos que se eluyen consecutivamente.

| Compuesto (HAP) | HRGC-FID | | |
|-----------------------------|------------------|-----------------|-------------------|
| | tr_{exp} (min) | $\log k'_{exp}$ | Δtr (min) |
| 01-Naftaleno | 3,917 | 0,511 | --- |
| 02-Acenaftileno | 5,005 | 0,646 | 1,088 |
| 03-Acenafteno | 5,093 | 0,655 | 0,088 |
| 04-Fluoreno | 5,472 | 0,693 | 0,379 |
| 05-Fenantreno (*) | 6,656 | 0,793 | 1,184 |
| 06-Antraceno | 6,697 | 0,796 | 0,041 |
| 07-Fluoranteno | 9,105 | 0,948 | 2,408 |
| 08-Pireno (*) | 9,874 | 0,987 | 0,769 |
| 09-Benzo(a)antraceno | 14,144 | 1,156 | 4,270 |
| 10-Criseno (*) | 14,443 | 1,166 | 0,299 |
| 11-Benzo(b)fluoranteno (*) | 18,679 | 1,284 | 4,236 |
| 12-Benzo(k)fluoranteno | 18,792 | 1,287 | 0,113 |
| 13-Benzo(j)fluoranteno | 18,899 | 1,289 | 0,107 |
| 14-Benzo(a)pireno | 20,277 | 1,322 | 1,378 |
| 15-Benzo(ghi)perileno | 24,448 | 1,406 | 4,171 |
| 16-Dibenzo(ah)antraceno (*) | 24,586 | 1,409 | 0,138 |
| 17-Indeno(123-cd)pireno | 25,601 | 1,427 | 1,015 |

(*) Conjunto de validación marcado en color naranja. // Los números marcados en azul representan los compuestos que han cambiado su orden de elución respecto al sistema cromatográfico de HPLC. // Se marcan en negrita los incrementos de tiempo inferiores a 0,3 min.

Por cromatografía de gases, el orden de elución de los HAPs en la columna VF17 se puede describir en orden creciente de puntos de ebullición de los compuestos. El orden de los isómeros del benzofluoranteno, cambia respecto a lo obtenido en HPLC. En HRGC el orden es BbF, BkF y BjF, mientras que en HPLC el BjF, BbF y BkF. Además, el orden de elución del DiBahA y BghiP también se invierte respecto a lo obtenido por HPLC (HRGC: BghiP-DiBahA; HPLC: DiBahA-BghiP).

Además, otro aspecto a tener en cuenta, es que los isómeros que cromatográficamente se separan con resolución adecuada por HRGC gracias a la elevada eficacia de la técnica, la diferencias entre sus tiempos de retención es muy pequeña (inferior a la especificación indicada por HPLC de 0,3 min). Esto puede ser un problema a la hora de discernir los isómeros con el modelo de predicción, teniendo en cuenta que la repetibilidad de los tiempos de retención es equivalente a la que se obtiene por HPLC.

Introduciendo los valores de $\log k'$ incluidos en la [Tabla 84] y con los descriptores del modelo QSRR (a_{nC} , n_{anell6} y $PM3_HOMO$), se desarrolla el modelo QSRR por HRGC. Los resultados de la ecuación obtenida y la importancia relativa de cada uno de los descriptores se incluyen en la [Tabla 85]. También se incluye, la ecuación y la importancia relativa de los descriptores en el modelo QSRR correspondientes al modelo de referencia por HPLC para facilitar la comparación.

Tabla 85. HRGC vs HPLC: Ecuaciones de los dos modelos QSRR y la importancia relativa de cada uno de los descriptores. El Modelo QSRR correspondiente al modelo HPLC que se utiliza como referencia y se describe en la [Ecuación 9].

| Modelo QSRR: HRGC | | |
|---------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| $\log k' =$ | 0,1280 | Importancia relativa / % |
| | +0,07757 · a_nC | 94,36 |
| | -0,00375 · n_anillo6 | 1,49 |
| | +0,04585 · PM3_HOMO | 4,16 |
| Modelo QSRR: HPLC (referencia) [Ecuación 9] | | |
| $\log k' =$ | 1,9936 | Importancia relativa / % |
| | +0,05773 · a_nC | 66,49 |
| | -0,04593 · n_anillo6 | 17,10 |
| | +0,19163 · PM3_HOMO | 16,41 |

Con la ecuación que se presenta en [Tabla 85] correspondiente al modelo QSRR obtenido por HRGC, se obtienen unos coeficientes de determinación (R^2) de 0,996 y 0,988 para el conjunto de entrenamiento y de validación, respectivamente. En la [Figura 59], se incluye la representación con los valores de $\log k'$ que se han obtenido por predicción respecto a los coeficientes de retención experimentales, en el modelo de HRGC.

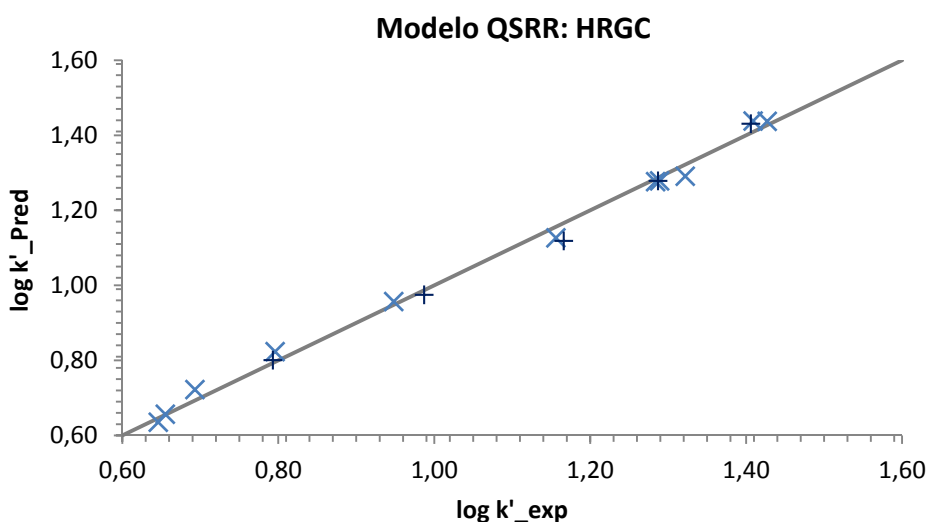


Figura 59. Comparación de los valores de $\log k'$ predichos con los modelos QSRR correspondiente al obtenido por HRGC, respecto al valor experimental, tanto para el conjunto de entrenamiento (x, $R^2=0,996$, $RMSE=0,021$) y de validación (+, $R^2=0,988$, $RMSE=0,026$)

Como se puede observar en el modelo QSRR propuesto por HRGC, los puntos se encuentran representados prácticamente todos sobre la línea de idealidad (línea gris), indicando que el modelo de predicción es bueno. Sin embargo, parece que los puntos se encuentran agrupados

en familias, concretamente en función del número de átomos de carbono. Este hecho, lleva a pensar, que el modelo presenta dificultades para discernir entre los isómeros.

Referente a la expresión $\log k'$ se observa que el número de átomos de carbono (a_{nC}) sigue siendo el primer descriptor en importancia, pero en este modelo le sigue el orbital molecular ocupado de mayor energía ($PM3_HOMO$) y finalmente, el número de anillos aromáticos de seis carbonos (n_{anell6}).

En lo que hace referencia a la contribución de los diferentes descriptores, también se ve modificada. El número de átomos de carbono representa una importancia relativa de casi el 95% dejando, únicamente, un 5% a la representación de los otros dos descriptores. Esto demuestra que en cromatografía de gases y con la columna utilizada, la elución de los compuestos se da principalmente, según su masa molecular y no intervienen, de forma significativa, ningún otro tipo de interacción externa. Esto dificulta la asignación de los valores de $\log k'$ suficientemente diferenciados para los diferentes isómeros y, consecuentemente, el modelo QSRR de predicción no presenta la capacidad de diferenciar, de forma significativa este tipo de compuestos.

3.5.3. Cambio en las dimensiones de la columna y en el sistema cromatográfico. Aplicación a la separación por UHPLC.

Debido a que se dispone de un método cromatográfico de separación de los HAPs por UHPLC, se propone conocer si los descriptores que son capaces de predecir y describir el sistema cromatográfico de separación de los HAPs por HPLC, son igualmente útiles para describir la separación de esta misma familia de compuestos pero en un sistema de UHPLC.

Se aprovecha el método de separación y el sistema cromatográfico que se ha utilizado para determinar el método de UHPLC para separar los HAPs. Así, se propone trabajar con la columna *Zorbax Eclipse PAH RRHD* (50 X 3 mm; 1,8 μm) en un sistema cromatográfico *Acquity UPLC®* de *Waters*.

El procedimiento de separación por UHPLC se describe en la [Tabla 60]. En las condiciones cromatográficas propuestas, los 16 HAPs a estudio se eluyen en un tiempo de retención inferior a 5 min y mantienen el orden de elución de la columna utilizada en el sistema cromatográfico de HPLC. Es importante tener en cuenta, que la reducción tan significativa de los tiempos de retención, puede ser un problema a la hora de discernir los compuestos con el modelo de predicción, si no se mejora sustancialmente la repetibilidad en los tiempos de retención.

Para obtener los datos experimentales a correlacionar, se realizan seis inyecciones en el método cromatográfico seleccionado, de un patrón conjunto de los 16 EPA-HAPs (100 ng/mL) con el marcador de tiempo muerto. Así, el patrón incluye además de los HAPs, cromato de potasio a una concentración de 0,4 % (p/v) y, por esta razón, se utiliza como disolvente la mezcla de acetonitrilo/agua MilliQ (70:30).

En la [Tabla 86] se presentan tanto los resultados de tiempos de retención como el promedio de las seis inyecciones realizadas. También se incluyen los valores de $\log k'$ promedio. En este caso, se ha utilizado como tiempo muerto, el correspondiente a cada una de las inyecciones realizadas. En todos los casos, el valor de tiempo muerto experimental, para este sistema es de $0,242 \pm 0,002$ min. Cabe destacar, que la variabilidad en los tiempos de retención es equivalente a la que se había obtenido por HPLC, haciendo imposible aumentar el número de cifras significativas de los tiempos de retención que servirán para calcular los $\log k'$ (datos cromatográficos experimentales de modelo).

Tabla 86. Datos experimentales de tiempos de retención (t_r) y $\log k'$, obtenidos en el método cromatográfico de separación de los HAPs por UHPLC, para el estudio del modelo de predicción con los intervalos de confianza (IC) obtenidos en cada caso. Además, también se incluye la diferencia entre los tiempos de retención de compuestos que se eluyen sucesivamente (Δt_r).

| Compuesto (HAP) | $t_r(\text{min}) \pm \text{IC}^{**}$ | $\Delta t_r (\text{min})$ | $\text{Log } k'_{\text{experimental}} \pm \text{IC}^{**}$ |
|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 01-Naftaleno | $1,561 \pm 0,001$ | --- | 0,736 $\pm 0,004$ |
| 02-Acenaftileno | $1,791 \pm 0,001$ | 0,23 | 0,805 $\pm 0,004$ |
| 03-Acenafteno | $2,164 \pm 0,001$ | 0,37 | 0,899 $\pm 0,004$ |
| 04-Fluoreno | $2,272 \pm 0,001$ | 0,11 | 0,923 $\pm 0,004$ |
| 05-Fenantreno (*) | $2,464 \pm 0,001$ | 0,19 | 0,962 $\pm 0,004$ |
| 06-Antraceno | $2,668 \pm 0,001$ | 0,20 | 1,000 $\pm 0,004$ |
| 07-Fluoranteno | $2,854 \pm 0,001$ | 0,19 | 1,032 $\pm 0,004$ |
| 08-Pireno (*) | $2,988 \pm 0,001$ | 0,13 | 1,054 $\pm 0,004$ |
| 09-Benzo(a)antraceno | $3,398 \pm 0,001$ | 0,41 | 1,115 $\pm 0,004$ |
| 10-Criseno (*) | $3,502 \pm 0,001$ | 0,10 | 1,129 $\pm 0,004$ |
| 11-Benzo(b)fluoranteno (*) | $3,770 \pm 0,001$ | 0,27 | 1,163 $\pm 0,004$ |
| 12-Benzo(k)fluoranteno | $3,910 \pm 0,002$ | 0,14 | 1,180 $\pm 0,004$ |
| 13-Benzo(a)pireno | $4,040 \pm 0,002$ | 0,13 | 1,195 $\pm 0,004$ |
| 14-Dibenzo(ah)antraceno (*) | $4,226 \pm 0,002$ | 0,19 | 1,216 $\pm 0,004$ |
| 15-Benzo(ghi)perileno | $4,346 \pm 0,002$ | 0,12 | 1,229 $\pm 0,004$ |
| 16-Indeno(123-cd)pireno | $4,466 \pm 0,003$ | 0,12 | 1,241 $\pm 0,004$ |

(*) Conjunto de moléculas del grupo de validación

**IC calculado con un 95% de confianza en la distribución de t de Student y $n=3$.

Una vez conocidos los datos experimentales de los tiempos de retención de los diferentes analitos, y calculados sus correspondientes coeficientes de retención, éstos se introducen en la quimioteca virtual. Se genera el modelo QSRR con los descriptores que describen el modelo QSRR de predicción desarrollado anteriormente basado en los descriptores a_{nC} , n_{anell6} y $PM3_HOMO$.

En la [Tabla 87], se presenta la ecuación del nuevo modelo QSRR generado con los datos de UHPLC. También se presentan los datos del modelo de HPLC, para que pueda servir de referencia.

Tabla 87. UHPLC vs HPLC: Ecuaciones de los dos modelos QSRR y la importancia relativa de cada uno de los descriptores. El Modelo QSRR correspondiente al modelo HPLC representa el valor de referencia y se describe en la [Ecuación 9].

| Modelo QSRR: HRGC | | |
|---------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| $\log k' =$ | 1,9752 | Importancia relativa / % |
| | +0,04898 · a_nC | 58,38 |
| | -0,06384 · n_anillo6 | 25,26 |
| | +0,17886 · PM3_HOMO | 16,37 |
| Modelo QSRR: HPLC (referencia) [Ecuación 9] | | |
| $\log k' =$ | 1,9936 | Importancia relativa / % |
| | +0,05773 · a_nC | 66,49 |
| | -0,04593 · n_anillo6 | 17,10 |
| | +0,19163 · PM3_HOMO | 16,41 |

El ajuste que ofrece el modelo QSRR del sistema obtenido por UHPLC es aceptable en lo que hace referencia a los valores de coeficiente de determinación (R^2), ya que ofrece un valor de 0,985 para el conjunto de moléculas de entrenamiento y de 0,989 para las de validación. Esta ecuación retorna unos valores de $\log k'$ predichos que se representan en la [Figura 60] frente a los valores experimentales.

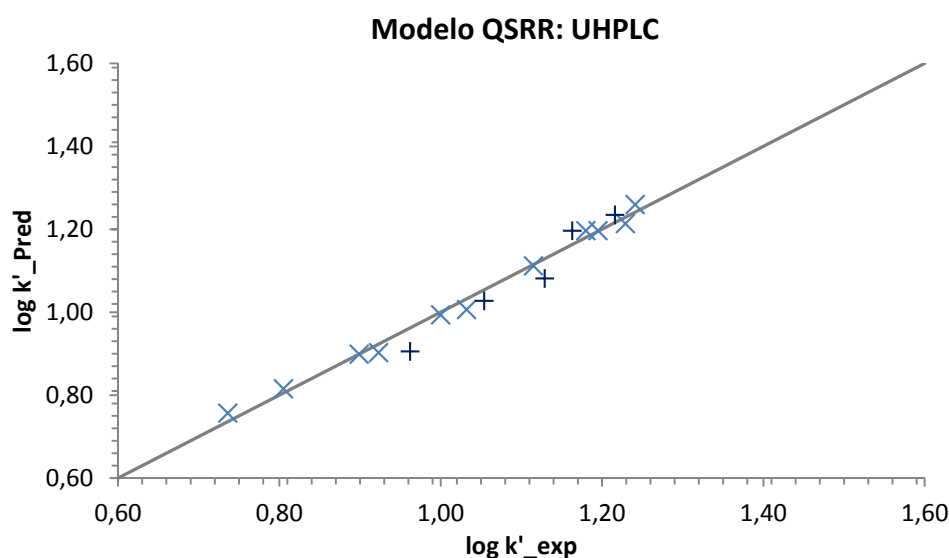


Figura 60. Representación de los valores de $\log k'$ predichos con el modelo QSRR de UHPLC, respecto a los valores experimentales de $\log k'$, tanto para el conjunto de entrenamiento (X, $R^2=0,985$, $RMSE=0,015$) y de validación (+, $R^2=0,989$, $RMSE=0,042$)

El primer hecho diferencial del modelo QSRR obtenido por UHPLC, es que los valores de $\log k'$ predichos presentan mayor desviación respecto a los valores experimentales, obteniendo

valores de residuales de hasta un -11% para el fenantreno y -10% para el criseno (valores máximos). En este caso, estas desviaciones son más importantes ya que el margen de tiempos de retención en los que se mueven los compuestos a estudio es mucho menor y, consecuentemente, se necesitaría una mayor precisión en los datos experimentales para poder diferenciar tiempos de retención que se encuentran tan juntos entre ellos.

Si se estudia la importancia relativa de los descriptores en este nuevo modelo QSRR, cabe destacar, que son equivalentes a las del modelo de HPLC. El descriptor de mayor importancia es el número de carbonos, seguido del número de anillos aromáticos de seis carbonos y de la energía del orbital superior ocupado. Sin embargo, en el modelo QSRR del sistema UHPLC, el porcentaje relativo del descriptor más importante (a_{nC}) es ligeramente menor en detrimento del aumento del porcentaje del descriptor n_{anell6} . Este efecto, ya se había observado cuando se han comparado los diferentes gradientes de elución. El cambio de los porcentajes de los descriptores en el modelo QSRR de UHPLC es equivalente a lo que sucedía con un gradiente rápido. En realidad, los sistemas UHPLC se caracterizan por tener gradientes muy rápidos pero suficientes para separar los compuestos gracias a la elevada eficacia de los sistemas.

Así, queda claro, que si la eficacia del sistema cromatográfico es elevada y/o el tiempo de cromatograma disminuye mucho, la precisión del ajuste de los modelos QSRR es insuficiente y se reduce claramente la capacidad de predicción del modelo, cuando se trabaja con sistemas que los datos experimentales sólo permiten tener tres cifras significativas. Para que los modelos QSRR funcionen correctamente en estos casos, es necesario mejorar claramente la precisión tanto de los datos experimentales como del modelo de predicción.

3.5.4. Cambio en la familia de compuestos. Aplicación a una familia de derivados de los HAPs: los nitro-HAPs.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos nitrados (nitro-HAPs) son derivados de los HAPs. Se caracterizan por contener, al menos, un grupo funcional nitro (NO_2) en su estructura. Estos compuestos se encuentran en la naturaleza junto con los HAPs de origen. Durante los últimos años, ha surgido una cierta preocupación sobre los posibles efectos relacionados con la salud y el medioambiente de los nitro—HAPs, pues constituyen una de las clases más importantes de contaminantes ambientales debido a su carácter mutagénico y carcinogénico. Es por ello, que diversos estudios se han centrado en la determinación de los nitro-HAPs en distintas matrices y muestras ambientales. (Albinet, Leoz-Garziandia, Budzinski, Villenave, & Jaffrezo, 2008)

Los nitro-HAPs, al igual que los HAPs, se forman fundamentalmente como productos directos o indirectos de la combustión incompleta de la materia orgánica, aunque una pequeña cantidad de estos compuestos procede de la industria. La mayoría de estos compuestos se forman a partir de los HAPs de origen (precursores). Los procesos de formación más habituales se basan

fundamentalmente en la nitración del HAP durante los procesos de combustión. Aunque también se forman en la atmósfera a partir del HAP precursor, bien por reacciones en fase gaseosa o bien mediante interacción heterogénea gas-partícula con radicales NO_x. (Miet, Le Menach, Flaud, & Budzin, 2009); (Zhang, Yang, Gan, Liu, & Shu, 2011)

Los nitro-HAPs tienen un particular interés ambiental debido a que son extraordinariamente más mutagénicos (2×10^5 veces superior) y carcinogénicos (10 veces superior) que sus HAPs precursores. Aunque éstos se encuentren en muy baja concentración en el aire ambiente (del orden de los $\mu\text{g}/\text{m}^3$). (Kielhorn, Wahnschaffe, & Mangelsdorf)

Por estas razones, se ha creído interesante trabajar con esta familia de compuestos, en paralelo al estudio de los HAPs, ya que estos pueden estar presentes en muestras ambientales, aunque probablemente en concentraciones 10 o 100 veces inferiores que los HAPs.

Además de los bajos niveles de concentración en los que los nitro-HAPs se pueden encontrar en las muestras ambientales, la dificultad de trabajar con esta familia de compuestos radica tanto en la cantidad de isómeros posibles, que se incrementa a medida que aumenta la masa molecular del compuesto precursor, como en la falta de patrones de referencia para su identificación y cuantificación. Por esta razón, se ha considerado interesante, en la presente tesis, disponer de un modelo QSRR que sea capaz de predecir los tiempos de retención de estos compuestos nitrados, derivados de los HAPs.

- **Nitro-HAPs a estudio. Patrones de trabajo.**

Para poder estudiar la relación estructura-retención de esta familia de compuestos, es necesario conocer los tiempos de retención de un conjunto de moléculas suficientemente importante de esta familia.

Se decide trabajar con los nitro-derivados de los HAPs prioritarios por la EPA, acotando el máximo en el derivado del benzo(a)pireno, ya que, parece que la presencia de compuestos nitrados derivados de los HAPs más pesados es poco probable en muestras ambientales. Esta información se ha obtenido gracias a la disposición del Material de Referencia Certificado SRM 1649b "*Urban Dust*"²⁰, con el que se trabajará más ampliamente en el Capítulo III de la presente tesis, correspondiente al análisis de HAPs en muestras ambientales.

A pesar de que se ha acotado el número de nitro-HAPs, se descarta la posibilidad de comprar patrones individuales de todos los posibles isómeros ya que no se dispone de los recursos

²⁰ SRM 1649b "*Urban Dust*", es el Material de Referencia Certificado adecuado para el análisis de compuestos poco volátiles en muestras de inmisiones ambientales. Se corresponde con el material particulado de filtros captadores de partículas de zonas urbanas, triturados y homogeneizados. Este material de referencia es adecuado para determinar tanto los HAPs como los nitro-HAPs en muestras de inmisiones. Entre los nitro-HAPs presentes se incluyen del nitronaftaleno al nitrocriseno.

necesarios. Por esta razón, se decide buscar disoluciones de referencia de nitro-HAPs que contengan varios de los posibles compuestos a estudio. Así, se propone trabajar con un Material de Referencia Certificado: "SRM 2265: *Nitrated Aromatic Hydrocarbons in methylene chloride II*". Éste corresponde a una disolución de 16 nitro-HAPs que incluye desde el nitrofenantreno (3 anillos bencénicos) al nitrobenzo(a)pireno (5 anillos bencénicos) disueltos en cloruro de metileno. Esta disolución, debido a la falta de disponibilidad de patrones conjuntos de nitro-HAPs, se puede utilizar como patrón de calibración para la determinación de estos compuestos, especialmente por cromatografía de gases.

En la [Tabla 88], se presentan los compuestos que se incluyen en el SRM 2265 y su concentración certificada.

Tabla 88. Nitro-HAPs presentes en el Material de Referencia Certificado: SRM 2265 "Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Methylene Chloride II". Se incluye: el nombre del compuesto, su número CAS y la concentración del certificado tanto en $\mu\text{g/g}$ como en $\mu\text{g/mL}$.

| Compuesto | Número CAS | Concentración $\mu\text{g/g}$ | Concentración $\mu\text{g/mL}$ |
|--------------------------|------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 2-nitrofenantreno | 17024-18-9 | 3,73 \pm 0,08 | 4,94 \pm 0,11 |
| 3-nitrofenantreno | 17024-19-0 | 4,36 \pm 0,11 | 5,78 \pm 0,15 |
| 9-nitrofenantreno | 954-46-1 | 3,02 \pm 0,09 | 4,00 \pm 0,11 |
| 2-nitroantraceno | 3586-69-4 | 2,58 \pm 0,08 | 3,43 \pm 0,10 |
| 9-nitroantraceno | 602-60-8 | 4,58 \pm 0,15 | 6,07 \pm 0,20 |
| 2-nitrofluoranteno | 13177-29-2 | 4,12 \pm 0,11 | 5,46 \pm 0,15 |
| 3-nitrofluoranteno | 892-21-7 | 4,63 \pm 0,10 | 6,14 \pm 0,13 |
| 1-nitropireno | 5522-43-0 | 5,21 \pm 0,20 | 6,91 \pm 0,27 |
| 2-nitropireno | 789-07-1 | 3,24 \pm 0,08 | 4,29 \pm 0,10 |
| 4-nitropireno | 57835-92-4 | 3,30 \pm 0,07 | 4,38 \pm 0,09 |
| 6-nitrocriseno | 7496-02-8 | 2,91 \pm 0,08 | 3,85 \pm 0,11 |
| 7-nitrobenzo(a)antraceno | 20268-51-3 | 4,80 \pm 0,16 | 6,36 \pm 0,21 |
| 6-nitrobenzo(a)pireno | 63041-90-7 | 3,45 \pm 0,14 | 4,57 \pm 0,19 |
| 1-nitrobenzo(e)pireno | 91259-16-4 | 3,16 \pm 0,14 | 4,19 \pm 0,19 |
| 3-nitrobenzo(e)pireno | 81340-58-1 | 1,49 \pm 0,26 | 1,98 \pm 0,34 |

Además, para completar el conjunto de nitro-HAPs, y para poder corroborar los tiempos de retención de alguno de los compuestos incluidos en el Material de Referencia Certificado SRM 2265, se han adquirido cinco patrones individuales de la casa comercial *Dr. Ehrenstorfer* (tres de ellos en disolución y uno como sustancia pura). Los patrones individuales se incluyen en la [Tabla 89]

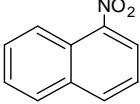
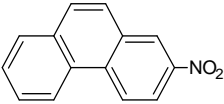
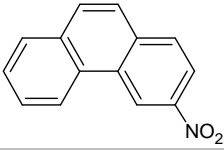
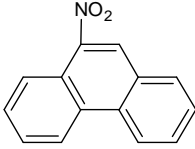
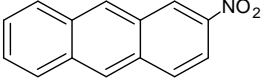
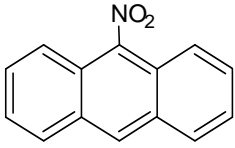
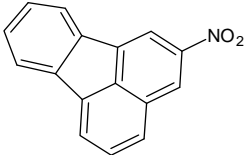
Tabla 89. Listado de nitro-HAPs que se han adquirido de forma individual (como disolución o sustancia pura) de la casa comercial Dr. Ehrenstorfer. Se incluye su número CAS, la referencia de la casa comercial, la concentración de la disolución y el disolvente en que se ha adquirido la disolución.

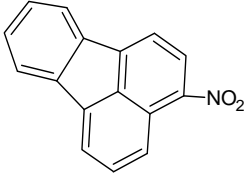
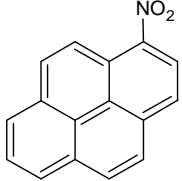
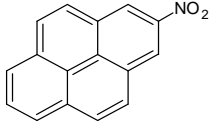
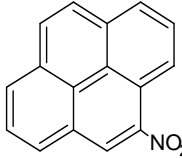
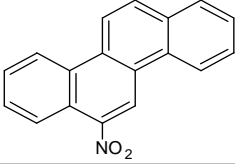
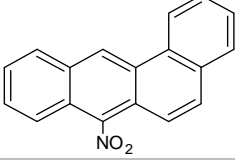
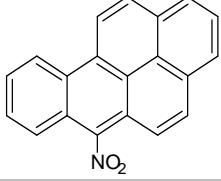
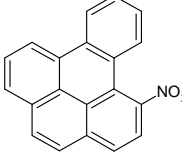
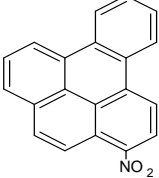
| Compuesto | Número CAS | Referencia Dr. Ehrenstorfer | Concentración | Disolvente |
|-----------------------|------------|-----------------------------|----------------------|-------------|
| 1-nitronaftaleno | 86-57-7 | L20965100CY | 10 ng/ μL | Ciclohexano |
| 3-nitrofluoranteno | 892-21-7 | L20964700CY | 10 ng/ μL | Ciclohexano |
| 9-nitrofenantreno | 954-46-1 | L20966600CY | 10 ng/ μL | Ciclohexano |
| 1-nitropireno | 5522-43-0 | C20967100 | Substancia pura | --- |
| 6-nitrobenzo(a)pireno | 63041-90-7 | L20962800CY | 10 ng/ μL | Ciclohexano |

Como se puede observar, entre la disolución del Material de Referencia Certificado y los patrones adquiridos individualmente, se dispone de prácticamente de al menos un derivado nitrado de cada uno de los HAPs sobre los que se ha hecho el estudio del modelo de predicción (16 EPA HAPs+ BjF). Realmente, sólo faltan derivados de acenaftileno, acenafteno y fluoreno, que corresponden a los HAPs con dos anillos bencénicos y un puente de cinco átomos de carbono, además de derivados de los tres isómeros del benzofluoranteno. Sin embargo, se dispone de derivado nitrado de benzo(e)pireno, compuesto no incluido en el modelo QSRR de los HAPs. Además, hay que destacar, que en muchos de los casos, se dispone de más de un isómero de posición del grupo nitro, que permitirá estudiar si el modelo de predicción propuesto, es capaz de diferenciarlos.

En la [Tabla 90], se presenta el listado de los nitro-HAPs que se utilizarán para determinar el modelo de predicción. En todos los casos, se incluye su estructura química, su masa molecular y su punto de ebullición.

Tabla 90. Listado de los nitro-HAPs que se van a utilizar para determinar el modelo QSRR. Se incluyen sus nombres y abreviaturas, su punto de ebullición bibliográfico y se estructura química.

| Compuesto/ Abreviatura | MW | Punto de ebullición (*) | Estructura química |
|--------------------------------------------|-------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 1-nitronaftaleno/ 1-NNa | 173,2 | 304°C |  |
| 2-nitrofenantreno/ 2-NFe ó 2-NPa | 223,2 | 424°C |  |
| 3-nitrofenantreno/ 3-NFe ó 3-NPa | 223,2 | 424°C |  |
| 9-nitrofenantreno/ 9-NFe ó 9-NPa | 223,2 | 413°C |  |
| 2-nitroantraceno/ 2-NAn ó 2-NA | 223,2 | 424°C |  |
| 9-nitroantraceno/ 9-NAn ó 9-NA | 223,2 | 413°C |  |
| 2-nitrofluoranteno/ 2-NF ó 2-NFa ó 2-NF | 247,3 | 456°C |  |

| Compuesto/ Abreviatura | MW | Punto de ebullición (*) | Estructura química |
|--------------------------------------------|-------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 3-nitrofluoranteno/ 3-NF ó 3-NFa ó 3-NF | 247,3 | 446°C |  |
| 1-nitropireno/ 1-NPyr ó 1-NP | 247,3 | 446°C |  |
| 2-nitropireno/ 2-NPyr ó 2-NP | 247,3 | 456°C |  |
| 4-nitropireno/ 4-NPyr ó 4-NP | 247,3 | 446°C |  |
| 6-nitrocriseno/ 6-NCry | 273,3 | 505°C |  |
| 7-nitrobenzo(a)antraceno/ 7-NBaA | 273,3 | 495°C |  |
| 6-nitrobenzo(a)pireno/ 6-NBaP | 297,3 | 524°C |  |
| nitrobenzo(e)pireno/ 1-NBeP | 297,3 | 534°C |  |
| 3-nitrobenzo(e)pireno/ 3-NBeP | 297,3 | 534°C |  |

(*) Puntos de ebullición bibliográficos a 760 mmHg (LookChem. Search Chemicals, 2008-2012)

Si se observan los puntos de ebullición de los nitro-HAPs incluidos en la [Tabla 90], se puede decir que:

- Éstos son siempre mayores a los de los HAPs precursores [Tabla 3].
- No siempre coinciden los valores para los diferentes isómeros de posición del grupo nitro de un determinado compuesto. Normalmente, cuanto más protegido estructuralmente se encuentre el grupo nitro menor es el punto de ebullición del compuesto.

Estos aspectos, se considerarán a la hora de determinar el orden de elución experimental de los compuestos a estudio.

• Método cromatográfico para el análisis de los nitro-HAPs. Datos experimentales de tiempo de retención y *logk'*.

En cuanto a las técnicas analíticas que se conocen para la determinación de los nitro-HAPs, se incluyen tanto la cromatografía de gases como la cromatografía líquida.

La cromatografía de gases presenta como principal ventaja su elevada eficacia que permite la separación de un gran número de compuestos e isómeros. Sin embargo, la principal limitación, igual que sucedía con los HAPs, viene determinada por la baja volatilidad de la mayoría de estos compuestos. (Barrado Olmedo A. , 2013)

En caso de la técnica de cromatografía líquida con detector de fluorescencia, aunque es una técnica habitual para la determinación de los HAPs, no es tan común en la determinación de los nitro-HAPs debido a su bajo, o casi nulo, carácter fluorescente. Para poder utilizar esta técnica en la determinación de los nitro-HAPs, es imprescindible una reducción del grupo nitro a grupo amino, analizando así los amino derivados. (Cvacka, Barek, Fogg, Moreira, & Zima, 1998), (Al-Kindya & Miller, 2008)

Aunque se dispone de un método de separación de los nitro-HAPs por HPLC-FLU previa reducción de los nitro-HAPs con borohidruro de sodio en presencia de cloruro de cobre (II)²¹, se decide trabajar con cromatografía de gases, ya que se utilizan las mismas condiciones cromatográficas propuestas para la determinación de los 16 HAPs prioritarios para la EPA por HRGC. Así, las condiciones cromatográficas se presentan en la [Tabla 91].

²¹ Corresponde a una reducción discontinua del grupo NO₂ a NH₂ utilizando borohidruro de sodio como agente reductor con la ayuda de un haluro de metal de transición como el cloruro de cobre (II) que actúa como catalizador. Si bien el borohidruro de sodio es conocido como uno de los mejores agentes reductores de cetonas y de algunos ésteres, no tiene habilidad para reducir nitrilos, amidas y nitrocompuestos a las correspondientes aminas primarias. Para incrementar la efectividad en la reducción de grupos nitro a amino, especialmente en los compuestos nitrados de hidrocarburos aromáticos, se añades sales de metales de transición como es el caso del cloruro de cobre (II). (Rahman & Al Deyab, 2011)

Tabla 91. Condiciones cromatográficas para la determinación de los nitro-HAPs por HRGC.

| Método cromatográfico para la determinación de los nitro-HAPs por HRGC | |
|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Columna | VF17-MS (20m X 0,15 mm x 0,05 µm) |
| Gas portador | Helio |
| Inyección | Modo: <i>Split (5:1)</i> Temperatura: 325 °C Volumen inyección: 1 µL Liner: <i>Focus liner</i> Septum: <i>Non-stick BTO</i> |
| Programa de temperatura | Temperatura inicial: 60°C durante 3,10 min Programa: 60°C a 195°C (30°C/min) hasta 205°C (10°C/min) hasta 250°C (20°C/min) hasta 310°C (5°C/min) |
| Modo de trabajo | Presión constante 40 psi |
| Línea de transferencia | Temperatura: 325°C |
| Detección | Modo de ionización: Impacto electrónico a 70 eV Temperatura de la fuente de iones: 300°C Temperatura del cuadrupolo (Selector de iones): 150°C Detección en modo SIM |
| Tiempo de cromatograma | 21 min |

En la [Figura 61], se presenta una superposición de los cromatogramas obtenidos al analizar tanto una disolución de aproximadamente 1000 ng/mL del SRM 2265 como de los patrones individuales por HRGC-MS en las condiciones cromatográficas indicadas en la [Tabla 91]. En este caso, la detección se realiza en modo SCAN (m/z entre 50 y 320), para poder disponer del espectro de masas de cada uno de los picos, de manera que resulte más fácil su identificación.

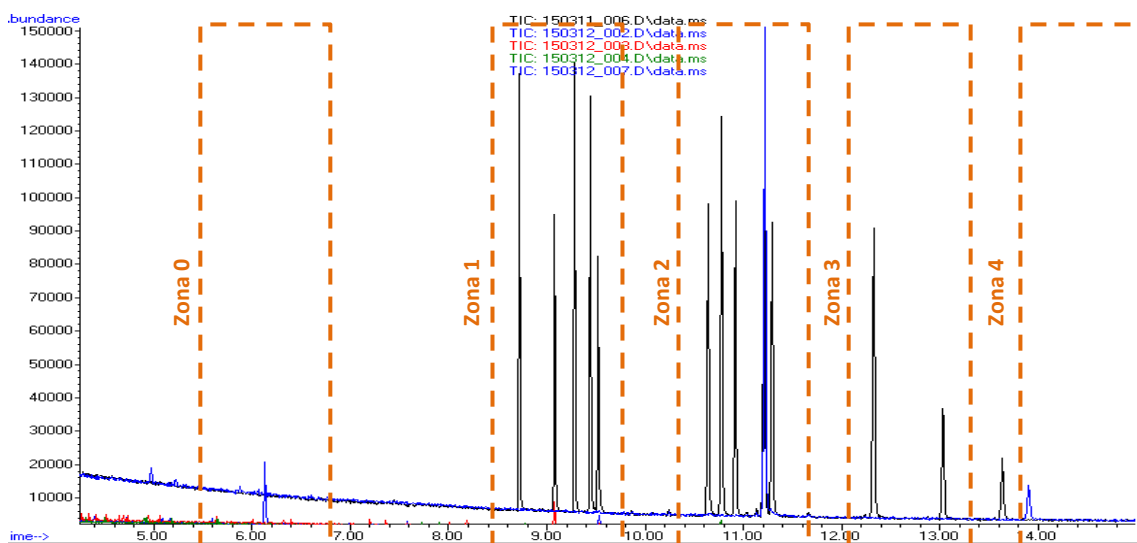


Figura 61. Superposición de los cromatogramas obtenidos al analizar una disolución del SRM 2265 y disoluciones de los patrones de nitro-HAPs individuales, por HRGC-MS en modo SCAN.

Como se puede observar en la [Figura 61], los picos 16 nitro-HAPs presentes en el SRM 2265 se separan en las condiciones cromatográficas propuestas. Cabe destacar, que en el cromatograma aparecen 17 picos, correspondientes a los 16 nitro-HAPs indicados en la [Tabla 88] y, además, aparece el pico correspondiente al compuesto 3-nitrofenantrona, también presente en el patrón pero que no forma parte de la familia de los nitro-HAPs.

Los 16 picos que aparecen en el cromatograma, se pueden dividir según su zona de elución. Es importante tener en cuenta que aunque la columna utilizada es capaz de separar los isómeros, ellos se encontrarán en la misma zona del cromatograma. En principio, es de esperar, que los compuestos se eluyan de forma muy parecida a la que lo hacían los HAPs en esta misma columna, aunque la diferenciación entre los isómeros, no se pueda conocer a priori. Así, siguiendo esta premisa, el cromatograma se puede dividir en diferentes zonas, donde se situarán los diferentes compuestos a estudio.

Así, se pueden diferenciar las siguientes zonas:

- *Zona 0*: que contiene un único pico que corresponde con al único isómero del nitronaftaleno (1-nitronaftaleno).
- *Zona 1*: donde se eluyen un total de 5 picos. Entre los que se encontrarán los isómeros de m/z 223, que corresponden tanto al nitroantraceno (2 disponibles: 2 y 9) como al nitrofenantreno (3 disponibles: 2, 3 y 9).
- *Zona 2*: donde se eluyen un total de 5 picos. Entre los que se encontrarán los isómeros de m/z 247, que corresponden tanto al nitropireno (3 disponibles: 1,2 y 4) como al nitrofluoranteno (2 disponibles: 2 y 3).
- *Zona 3*: donde se eluyen dos picos con una resolución elevada. Estos dos picos, corresponderán, a los isómeros de m/z 273 que coinciden con los nitro-derivados del BaA y Cry. En este caso, se eluye primero el 7-nitrobenzo(a)antraceno seguido del 6-nitrocriseno. El orden de elución de estos dos compuestos se ha corroborado tanto por el espectro de masas (ambos compuestos tienen las mismas fragmentaciones, pero sus abundancias relativas son diferentes) y, además, por su concentración en el SRM 2265. Suponiendo que ambos tengan respuestas equivalentes, el 7-nitrobenzo(a)antraceno se encuentra al doble de concentración que el 6-nitrocriseno en la disolución, por lo que, es de esperar, que el pico del 7-nitrobenzo(a)antraceno sea mayor que el de 6-nitrocriseno. Este efecto se puede ver acusado porque existe, igual que sucedía con los HAPs, una cierta pérdida de linealidad a medida que aumenta la masa molecular del compuesto.
- *Zona 4*: donde se eluyen tres picos, que corresponden con los isómeros de m/z 297. Dos de ellos, aparecen parcialmente solapados y el otro se eluye ligeramente más tarde. Así, en esta zona se encuentran los picos correspondientes tanto a los nitro-derivados del benzo(e)pireno (se tienen dos isómeros disponibles: 1 y 3) y del benzo(a)pireno (con un único isómero disponible).

Entre la zona 3 y 4, se eluye el pico correspondiente al compuesto 3-nitrofenantrona (presente en la disolución de SRM 2265, pero que no forma parte de la familia de los nitro-HAPs). Este

compuesto se ha confirmado por similitud entre el espectro de masas obtenido experimentalmente y el espectro bibliográfico obtenido desde la biblioteca *NIST*.

Así, una vez dividido el cromatograma en las diferentes zonas y situados los compuestos de cada zona, se procede a la identificación de los diferentes isómeros. Para ello, se han tenido en cuenta dos consideraciones:

- ✓ Los tiempos de retención de los nitro-derivados disponibles de forma individual. Así, se ha confirmado que:
 - El segundo pico de la *zona 1* corresponde al 9-nitrofenantreno.
 - El segundo pico de la *zona 2* corresponde al 3-nitrofluoranteno y el cuarto pico corresponde al 1-nitropireno.
 - El primer pico de la *zona 4* corresponde al 6-nitrobenzo(a)pireno.
- ✓ Los tiempos de retención de los isómeros que se especifican en el artículo "*Determination and comparison of nitrated-polycyclic aromatic hydrocarbons measured in air and diesel particulate reference materials*" (Bamford, Bezabeh, Schantz, Wise, & Baker, 2003)

En este artículo, se presentan los órdenes de elución tanto de los isómeros de m/z 223, 247 y 297 en una columna de polaridad media (50% fenil-50% metilpolisiloxano) y hace una comparación con el orden en una columna de polaridad baja (5% fenil-95% metilpolisiloxano). Este estudio es adecuado ya que la columna que se está utilizando para la separación de los nitro-HAPs en una VF17 MS, columna de polaridad media cuya fase estacionaria coincide con la utilizada en el artículo de referencia.

En la [Figura 62] se presentan los órdenes de elución de estos tres grupos de compuestos, presentados en el artículo de referencia. (Bamford, Bezabeh, Schantz, Wise, & Baker, 2003)

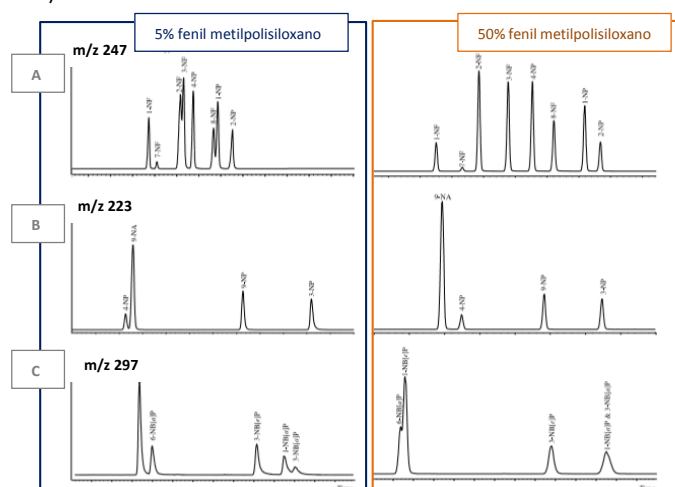


Figura 62. Comparación de los perfiles obtenidos por GC/MS obtenidos en una columna 5%-fenil metilpolisiloxano y otra 50% fenil metilpolisiloxano en (A) una mezcla de isómeros del nitrofluoranteno (NF) y nitropireno (NP) con m/z 247 (B) una mezcla de isómeros del nitroantraceno (NA) y nitrofenantreno (NP) con m/z 223 (C) una mezcla de isómeros del nitrobenzo(e)pireno (NB[e]P) y del nitrobenzo(a)pireno (NB[a]P) con $m=z$ 297. (Bamford, Bezabeh, Schantz, Wise, & Baker, 2003)

Como se puede observar en la [Figura 62] el orden de elución de los isómeros, tanto de m/z 223, como de m/z 247 como m/z 297 en una columna de polaridad media 50% fenil-50% metilpolisiloxano, es el siguiente:

- **Isómeros m/z 223** (nitroantraceno/nitrofenantreno):
9-nitroantraceno, 4-nitrofenantreno, 9-nitrofenantreno y 3-nitrofenantreno.
Así, los dos primeros picos de la *zona 1* de la [Figura 61] corresponden, por orden de elución, con el 9-nitroantraceno y el 9-nitrofenantreno (confirmado con patrón).
Los tres últimos picos corresponden al 2-nitroantraceno y al 2 o 3-nitrofenantreno. Para confirmar el orden de elución de estos compuestos, se ha tenido que considerar sus concentraciones en el patrón disponible, siendo respectivamente, 2,58 $\mu\text{g/g}$, 3,73 $\mu\text{g/g}$ y 4,36 $\mu\text{g/g}$. Así, teniendo en cuenta que en este caso no hay pérdida de linealidad ya que son compuestos poco pesados se puede decir que el orden de elución de estos compuestos es 3-nitrofenantreno, 2-nitrofenantreno y 2-nitroantraceno.
- **Isómeros m/z 247** (nitrofluoranteno/nitropireno):
2-nitrofluoranteno, 3-nitrofluoranteno, 4-nitropireno, 8-nitrofluoranteno, 1-nitropireno y 2-nitropireno.
Así, los cinco picos de la *zona 2* de la [Figura 61] quedan confirmados. El orden de elución es, en este caso, 2-nitrofluoranteno, 3-nitrofluoranteno, 4-nitropireno, 1-nitropireno y 2-nitropireno. Es importante destacar, que los picos correspondientes al 3-nitrofluoranteno y al 1-nitropireno se han confirmado con patrones individuales.
- **Isómeros m/z 297** (nitrobenzo(e)pireno/nitrobenzo(a)pireno):
6-nitrobenzo(a)pireno, 1-nitrobenzo(e)pireno y 3-nitrobenzo(e)pireno.
Así, los tres picos de la *zona 4* de la [Figura 61] quedan confirmados. El orden de elución es, 6-nitrobenzo(a)pireno, 1-nitrobenzo(e)pireno y 3-nitrobenzo(e)pireno, donde además, el pico de 6-nitrobenzo(a)pireno queda confirmado con el patrón individual.

Así, teniendo en cuenta todas estas consideraciones de orden de elución, se procede a obtener los datos experimentales de tiempos de retención y $\log k'$ de los nitro-HAPs imprescindibles para determinar el modelo QSRR. Así, se prepara un patrón con 1-nitronaftaleno y la disolución SRM 2265, donde todos los nitro-HAPs se encuentran a concentraciones equivalentes a 1 ng/mL preparados en acetona. Este patrón conjunto de nitro-HAPs se inyecta diez veces.

En este caso, como la inyección se realiza por cromatografía de gases con detector espectrómetro de masas, no es posible determinar el tiempo muerto como la primera señal del cromatograma (o la señal del disolvente), ya que se ha programado un *solvent delay* para evitar fundir el filamento. Por esta razón, se decide después de realizar las 10 inyecciones de patrón,

realizar 5 inyecciones de gas metano, con el mismo programa de temperaturas que se ha inyectado el patrón pero comenzando a detectar desde el inicio del cromatograma. Así se obtiene un tiempo muerto de $0,59 \pm 0,06$ min.

En la [Tabla 92], se presentan los resultados de tiempos de retención como el promedio del tiempo de retención obtenido en las diez inyecciones realizadas, para cada uno de los compuestos en el método cromatográfico que se presenta en la [Tabla 91]. Además, se incluyen los valores de $\log k'$ medios, que se han calculado utilizando como tiempo muerto 0,59 min.

Tabla 92. Datos experimentales de tiempos de retención (t_r) y $\log k'$, obtenidos para los nitro-HAPs en el método cromatográfico de HRGC propuesto.

| Compuesto (nitro-HAP) | $t_r(\text{min})$ | $\log k'_{\text{experimental}}$ |
|--------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| 01-1-nitronaftaleno | $6,140 \pm 0,001$ | $0,9706 \pm 0,0007$ |
| 02-9-nitroantraceno | $8,717 \pm 0,001$ | $1,1363 \pm 0,0002$ |
| 03-9-nitrofenantreno | $9,081 \pm 0,001$ | $1,1554 \pm 0,0003$ |
| 04-3-nitrofenantreno | $9,280 \pm 0,001$ | $1,1654 \pm 0,0003$ |
| 05-2-nitrofenantreno | $9,442 \pm 0,001$ | $1,1734 \pm 0,0002$ |
| 06-2-nitroantraceno | $9,527 \pm 0,001$ | $1,1776 \pm 0,0005$ |
| 07-2-nitrofluoranteno | $10,635 \pm 0,001$ | $1,2284 \pm 0,0004$ |
| 08-3-nitrofluoranteno | $10,771 \pm 0,001$ | $1,2342 \pm 0,0002$ |
| 09-4-nitropireno | $10,911 \pm 0,001$ | $1,2402 \pm 0,0004$ |
| 10-1-nitropireno | $11,200 \pm 0,001$ | $1,2522 \pm 0,0003$ |
| 11-2-nitropireno | $11,287 \pm 0,001$ | $1,2557 \pm 0,0002$ |
| 12-7-nitrobenzo(a)pireno | $12,312 \pm 0,001$ | $1,2955 \pm 0,0004$ |
| 13-6-nitrocriseno | $13,022 \pm 0,001$ | $1,3210 \pm 0,0004$ |
| 14-6-nitrobenzo(a)pireno | $16,166 \pm 0,001$ | $1,4189 \pm 0,0002$ |
| 15-1-nitrobenzo(e)pireno | $16,229 \pm 0,001$ | $1,4207 \pm 0,0002$ |
| 16-3-nitrobenzo(e)pireno | $17,513 \pm 0,001$ | $1,4207 \pm 0,0003$ |

Los valores promedio de $\log k'$ (marcados en negrita en la [Tabla 92]), son los valores experimentales a partir de los cuales se desarrollarán los modelos QSRR de predicción.

Antes de proceder a la aplicación del modelo QSRR, se propone hacer una comparación entre los tiempos de retención de los nitro-HAPs y de sus HAPs precursores que indiquen si es posible aplicar directamente el mismo modelo QSRR generado para los HAPs, si los descriptores pueden ser los mismos o si se necesitan nuevos descriptores para definir la retención de estos compuestos en el sistema cromatográfico propuesto [Tabla 91]

Como en el caso de los nitro-HAPs existen isómeros posicionales del grupo nitro y en el caso de los HAPs esto no sucede, para comparar los tiempos de retención, se decide hacer un promedio de los tiempos de retención de los diferentes isómeros de cada uno de los nitro-HAPs y se compara con el HAP precursor. En la [Tabla 93] se presentan estos resultados comparativos de tiempos de retención.

Tabla 93. Tiempos de retención comparativos entre los nitro-HAPs y los HAPs en las mismas condiciones de trabajo.

| Compuesto (nitro-HAP) | tr(min) nitro-HAP | Compuesto (HAP) | tr(min) HAP (**) | Δ tr (nitro-HAP)-(HAP) |
|------------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------------------|
| Nitronaftaleno | 6,140 | Naftaleno | 5,27 | 0,870 |
| Nitroantraceno | 9,122 (*) | Antraceno | 8,95 | 0,172 |
| Nitrofenantreno | 9,268 (*) | Fenantreno | 8,55 | 0,718 |
| Nitrofluoranteno | 10,703 (*) | Fluoranteno | 10,06 | 0,643 |
| Nitropireno | 11,133 (*) | Pireno | 10,42 | 0,713 |
| Nitrobenzo(a)antraceno | 12,312 | Benzo(a)antraceno | 11,83 | 0,482 |
| Nitrocriseno | 13,022 | Criseno | 12,33 | 0,692 |
| Nitrobenzo(a)pireno | 16,166 | Benzo(a)pireno | 15,57 | 0,596 |
| Nitrobenzo(e)pireno | 16,871 (*) | Benzo(e)pireno | 15,45 | 1,421 |

(*) Promedio de los diferentes isómeros de posición del grupo nitro

(**) Tiempos de retención incluidos en la [Tabla 46]

Como se puede observar en la [Tabla 93], no parece posible que se pueda aplicar directamente el mismo modelo QSRR para los HAPs en cromatografía de gases, ya que la diferencia entre los tiempos de retención entre el nitro-HAP y su HAP precursor no se mantiene constante, especialmente para el nitrobenzo(e)pireno y para el nitroantraceno. Por esta razón, se decide descartar esta posibilidad y trabajar con un nuevo modelo QSRR pero que parta de los mismos descriptores propuestos para los HAPs, cosa que indicaría que los fundamentos de separación de ambas familias de compuestos son equivalentes.

- **Modelo QSRR para los nitro-HAPs.**

Para poder generar el modelo QSRR, primero se crea la biblioteca virtual de los nitro-HAPs. Así, se construye la base de datos en el programario MOE 2010, donde se incluye la estructura química de las moléculas, los valores de $\log k'$ experimentales [Tabla 92] y el conjunto de descriptores que se utilizarán en el modelo. En una primera etapa, se incluyen los mismos descriptores del modelo QSRR de los HAPs (α_{nC} , n_{anell6} y $PM3_HOMO$).

En este caso, los 16 compuestos formarán parte del grupo de entrenamiento y validación, ya que muchos de ellos son isómeros de posición del grupo nitro y, separando moléculas se podría perder representatividad.

En la [Tabla 94], se presentan los valores de los descriptores que se incluirán en el modelo QSRR para los nitro-HAPs.

Tabla 94. Valores de los descriptores moleculares, propuestos para diseñar el modelo de predicción del análisis de nitro-HAPs por HRGC.

| Nombre | a_nC | n_anell6 | PM3_HOMO |
|--------------------------|------|----------|----------|
| 01-1-nitronaftaleno | 2 | 10 | -9,580 |
| 02-9-nitroantraceno | 3 | 14 | -8,956 |
| 03-9-nitrofenantreno | 3 | 14 | -9,415 |
| 04-3-nitrofenantreno | 3 | 14 | -9,345 |
| 05-2-nitrofenantreno | 3 | 14 | -9,273 |
| 06-2-nitroantraceno | 3 | 14 | -8,817 |
| 07-2-nitrofluoranteno | 3 | 16 | -9,265 |
| 08-3-nitrofluoranteno | 3 | 16 | -9,287 |
| 09-4-nitropireno | 4 | 16 | -8,803 |
| 10-1-nitropireno | 4 | 16 | -8,857 |
| 11-2-nitropireno | 4 | 16 | -8,761 |
| 12-7-nitrobenzo(a)pireno | 4 | 18 | -8,974 |
| 13-6-nitrocriseno | 4 | 18 | -9,074 |
| 14-6-nitrobenzo(a)pireno | 5 | 20 | -8,658 |
| 15-1-nitrobenzo(e)pireno | 5 | 20 | -8,863 |
| 16-3-nitrobenzo(e)pireno | 5 | 20 | -8,876 |

Con estos valores, se realiza el ajuste por mínimos cuadrados de los descriptores con la finalidad de obtener la ecuación que describe el coeficiente de retención ($\log k'$) como combinación lineal de los tres descriptores escogidos. Además, como en los anteriores modelos, se determina el coeficiente de determinación (R^2), del que se fija como criterio que sea superior a 0,95 y el error cuadrático medio del ajuste ($RMSE$).

Los resultados de la ecuación obtenida y la importancia relativa de cada uno de los descriptores se incluyen en la [Tabla 95]. También se incluye, la ecuación y la importancia relativa de los descriptores en el modelo QSRR correspondientes al modelo de referencia por HRGC.

Tabla 95. Nitro-HAPs vs HAPs por HRGC: Ecuaciones de los dos modelos QSRR y la importancia relativa de cada uno de los descriptores. El Modelo QSRR correspondiente al modelo HRGC de los HAPs que se utiliza como referencia y se describe en la página 189.

| Modelo QSRR NITRO-HAPs (HRGC) | |
|-------------------------------|---------------------------------|
| $\log k' =$ | 0,4975 |
| | +0,03177 · a_nC |
| | +0,03535 · n_anillo6 |
| | -0,0072 · PM3_HOMO |
| | Importancia relativa / % |
| | 76,53 |
| | 22,03 |
| | 1,44 |
| Modelo QSRR: HAPs (HRGC) | |
| $\log k' =$ | 0,1280 |
| | +0,07757 · a_nC |
| | -0,00375 · n_anillo6 |
| | +0,04585 · PM3_HOMO |
| | Importancia relativa / % |
| | 94,36 |
| | 1,49 |
| | 4,16 |

Con la ecuación que se presenta en [Tabla 95] correspondiente al modelo QSRR obtenido por HRGC para los nitro-HAPs, se obtiene un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9840. Aunque cumple con el criterio de aceptación establecido, si se compara con los valores del ajuste obtenido para los HAPs por HRGC ($R^2=0,9959$), los resultados son claramente peores.

Además, si se comparan las importancias relativas de los descriptores en los dos modelos QSRR propuestos por HRGC, se observa que aunque el número de átomos de carbono sigue siendo el descriptor con más peso en los dos modelos (tanto para los HAPs como para los nitro-HAPs), en el caso del modelo de los nitro-HAPs ha perdido importancia en detrimento del número de anillos bencénicos, que aumenta su importancia hasta el 22%. En realidad, la proporción del descriptor correspondiente al número de átomos de carbonos, recuerda más a un modelo QSRR de los HAPs pero en sistemas de HPLC, aunque en lugar de aumentar el descriptor PM3_HOMO aumenta la importancia del número de anillos bencénicos.

Esta distribución proporcional de los descriptores no favorece la predicción de isómeros de posición del grupo nitro.

En la [Figura 63], se incluye la representación con los valores de $\log k'$ que se han obtenido por predicción ($\log k'_{Pred}$) respecto a los coeficientes de retención experimentales ($\log k'_{Exp}$) del modelo QSRR para los nitro-HAPs determinados por HRGC.

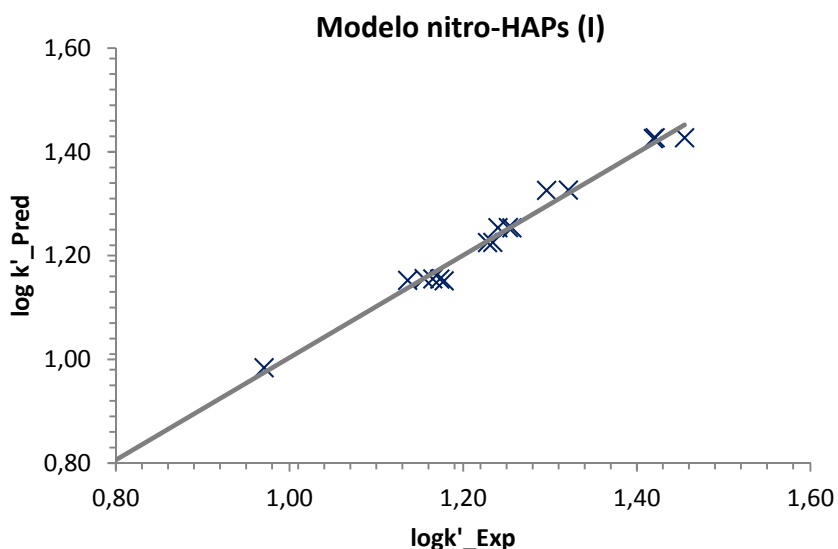


Figura 63. Comparación del valor de $\log k'$ que se ha predicho con el modelo QSRR para los nitro-HAPs con los descriptores del modelo de los HAPs analizados por HRGC, respecto del valor experimental ($R^2=0,984$, $RMSE=0,017$)

Como se puede observar en la [Figura 63], se confirma que el modelo QSRR propuesto para la descripción del sistema de separación de nitro-HAPs por HRGC no es capaz de diferenciar los isómeros de posición del grupo nitro, ya que sus $\log k'$ predichos coinciden, es decir, aparecen en la misma línea del eje de abscisas.

Por esta razón, se consideran insuficientes los descriptores propuestos para la descripción del modelo QSRR. En este caso, los descriptores que se incluyen en el modelo de separación de los HAPs, parecen insuficientes. Parece necesario incluir un descriptor que permita diferenciar los isómeros de posición cuando los HAPs incluyen un sustituyente nitro en su estructura.

Se propone introducir un descriptor que se había desestimado al desarrollar el modelo de HAPs pero que parece necesario, en este caso para los nitro-HAPs, como es el momento dipolar (*PM3_dipole*). Se trata de un descriptor de tipos 3Di, que depende de las coordenadas internas de la molécula, es decir, depende de su conformación. El momento dipolar, se trata de una propiedad con un importante componente de tipo electrostático y, por esta razón, se considera adecuada en este caso para definir la separación de HAPs con grupos nitro, sustituyente que puede ayudar a la ordenación de las cargas y variación de este descriptor.

En la [Tabla 96], se presenta los valores del descriptor *PM3_dipole* de los 16 nitro-HAPs. Estos valores se introducirán, conjuntamente con los otros tres descriptores propios de los HAPs para realizar el segundo modelo QSRR propuesto para la descripción de los tiempos de retención de los nitro-HAPs en el sistema de HRGC.

*Tabla 96. Valores del descriptor *PM3_dipole* correspondiente a los diferentes nitro-HAPs que se incluirán en el nuevo modelo de predicción del análisis de nitro-HAPs por HRGC.*

| Nombre | PM3_dipole |
|--------------------------|------------|
| 01-1-nitronaftaleno | 5,068 |
| 02-9-nitroantraceno | 5,323 |
| 03-9-nitrofenantreno | 5,352 |
| 04-3-nitrofenantreno | 5,924 |
| 05-2-nitrofenantreno | 6,138 |
| 06-2-nitroantraceno | 6,228 |
| 07-2-nitrofluoranteno | 5,843 |
| 08-3-nitrofluoranteno | 5,648 |
| 09-4-nitropireno | 5,417 |
| 10-1-nitropireno | 5,952 |
| 11-2-nitropireno | 6,208 |
| 12-7-nitrobenzo(a)pireno | 5,529 |
| 13-6-nitrocriseno | 5,491 |
| 14-6-nitrobenzo(a)pireno | 5,923 |
| 15-1-nitrobenzo(e)pireno | 5,502 |
| 16-3-nitrobenzo(e)pireno | 6,084 |

Con este nuevo descriptor (*PM3_dipole*) y los otros tres propuestos para los HAPs (*a_nC*, *n_anell6* y *PM3_HOMO*), se vuelve a realizar el ajuste por mínimos cuadrados de los descriptores para obtener la ecuación de descripción del nuevo modelo QSRR.

Los resultados de la ecuación obtenida y la importancia relativa de cada uno de los descriptores se incluyen en la [Tabla 97]. En la [Figura 64], se incluye la representación con los valores de *log k'* que se han obtenido por predicción (*log k'_Pred*) respecto a los coeficientes de retención experimentales (*log k'_exp*) del segundo modelo QSRR propuesto para los nitro-HAPs.

Tabla 97. Nitro-HAPs por HRGC con cuatro descriptores. Ecuación del modelo QSRR y la importancia relativa de cada uno de los descriptores.

| Modelo QSRR NITRO-HAPs con 4 descriptores (HRGC) | |
|--------------------------------------------------|--------------------------|
| log k' = | Importancia relativa / % |
| -0,1395 | |
| +0,0338 · a_nC | 58,57 |
| +0,0417 · n_anillo6 | 23,43 |
| -0,0051 · PM3_HOMO | 8,81 |
| +0,0406 · PM3_Dipole | 9,19 |

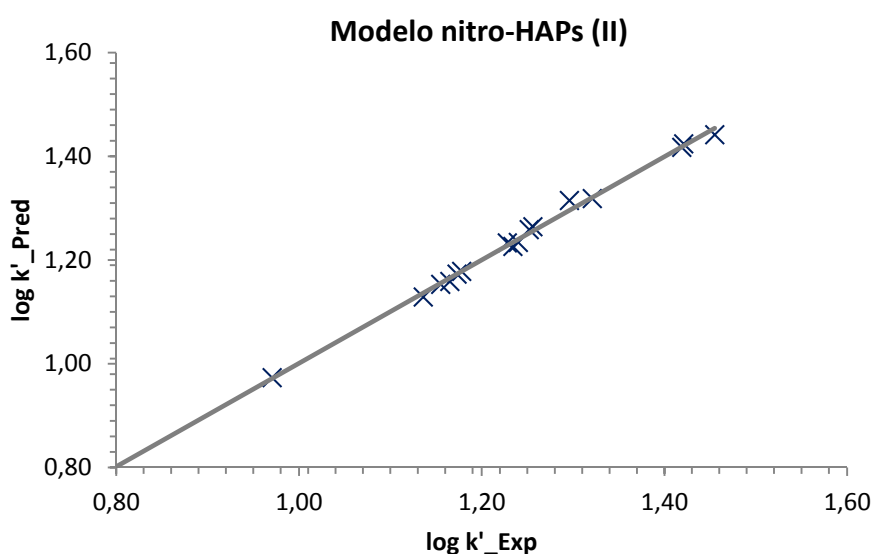


Figura 64. Comparación del valor de log k' que se ha predicho con el modelo QSRR para los nitro-HAPs con los descriptores del modelo de los HAPs analizados por HRGC, respecto del valor experimental (R²=0,996, RMSE=0,007)

Como se puede observar, con la introducción del nuevo descriptor (PM3_dipole) al modelo QSRR, el coeficiente de determinación (R²) ha aumentado sustancialmente (0,996) y ha disminuido el error cuadrático medio de 0,017 a 0,007. Además, si se tiene en cuenta la representación gráfica de los valores de coeficiente de partición (predichos vs experimentales) [Figura 64], queda claro que el momento dipolar ha permitido mejorar mucho el ajuste y, de esta manera, es posible la diferenciación entre isómeros de posición del grupo nitro.

Si se estudia la importancia relativa de los descriptores en el nuevo modelo propuesto para los nitro-HAPs, se observa que el número de átomos de carbono sigue siendo el descriptor con mayor importancia seguido del número de anillos bencénicos, equivalente a lo que sucedía en la separación de los HAPs. Así, la separación principal de los nitro-HAPs es función de su estructura de base proporcionada por los HAPs (descriptores a_nC y n_anillo6, ocupen una proporción del 82%). Sin embargo, los descriptores tanto del momento dipolar como de la energía del mayor orbital ocupado se dividen equitativamente el porcentaje restante. La importancia relativa correspondiente al momento dipolar se ha obtenido en disminución de los dos descriptores mayoritarios.

Se podría pensar en la posibilidad de eliminar el descriptor PM3_HOMO y sustituirlo por el PM3_dipole pero, se han obtenido mejores resultados si se consideran en el modelo estos dos descriptores.

Si se representan los valores residuales obtenidos en el ajuste por mínimos cuadrados de todos los nitro-HAPs se observa que todos los valores son inferiores o iguales al 6%, mejorando claramente el ajuste [Figura 65].

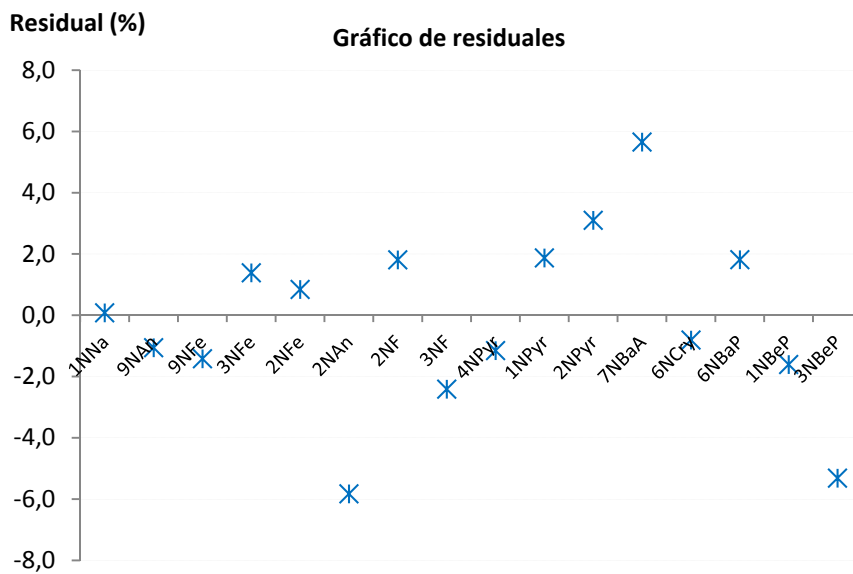


Figura 65. Gráfico de residuales (%) de los 16 nitro-HAPs a estudio, calculados a partir de la relación entre el tiempo de retención experimental y el obtenido por predicción del modelo QSRR definido con cuatro descriptores.

Así, el modelo QSRR de predicción para el estudio de la relación estructura-retención cromatográfica de los nitro-HAPs, en el sistema cromatográfico propuesto (HRGC), se describe en la [Ecuación 12].

$$\log k' = -0,1395 + 0,0417 \cdot a_{nC} + 0,0338 \cdot n_{anel6} - 0,052 \cdot PM3_HOMO + 0,0406 \cdot PM3_dipole$$

Ecuación 12. Ecuación correspondiente al modelo QSRR que describe la relación estructura-retención cromatográfica de los nitro-HAPs por HRGC

4. RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE LA APLICACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS QSRR AL ANÁLISIS DE HAPs: MODELO DE PREDICCIÓN Y ESTUDIO DE ROBUSTEZ.

Después del estudio realizado en relación de la aplicación de la metodología QSRR al análisis de HAPs se puede decir que:

- El modelo QSRR de predicción propuesto que describe la retención de los HAPs en el sistema de HPLC incluye tres descriptores moleculares: el número de átomos de carbono (66%), el número de anillos aromáticos con 6 átomos de carbonos (17%) y el orbital molecular ocupado de mayor energía (energía del HOMO) (16%). Cabe destacar que los dos descriptores de mayor importancia son equivalentes a los parámetros que se habían considerado en el Capítulo I Apartado 2.4 de la presente tesis, para justificar el orden de elución experimental de los HAPs en el sistema de HPLC. Sin embargo, en el Capítulo I, ya quedaba claro, que estos dos parámetros eran insuficientes para poder describir la separación de esta familia de compuestos, ya que ninguno de ellos permitía diferenciar isómeros. Es por esta razón, que se considera indispensable la inclusión en el modelo QSRR del tercer descriptor (energía del HOMO). Éste descriptor tiene interés en las separaciones donde se espera que las interacciones intermoleculares del par de electrones deslocalizados (dador-aceptor) sean importantes. De esta manera, el modelo presenta un buen ajuste y una elevada capacidad de predicción tanto de las moléculas que forman parte del grupo de entrenamiento como del de validación.
- En lo que hace referencia al orden de elución, la predicción hasta el pireno no se ve alterada (zona donde la separación cromatográfica entre picos presenta mejor resolución). Sin embargo, en la zona correspondiente a los compuestos más pesados, se observa una alteración del orden de elución obtenido por predicción con el modelo QSRR respecto del experimental en tres parejas de compuestos (BaA-Cry, B_jF-B_bF y DiBaA-BghiP). Cabe destacar que en estas tres parejas, uno de los compuestos pertenece al grupo de entrenamiento y otro al de validación. De manera que, el mayor error de ajuste del grupo de moléculas de validación junto con la peor separación cromatográfica de los compuestos más pesados hace que la predicción de los tiempos de retención difiera más de los valores experimentales, pudiendo verse alterado el orden de elución.
- El modelo QSRR obtenido es capaz de adaptarse a las condiciones del gradiente de elución. Sin embargo, se ha comprobado, que con el aumento del tiempo de gradiente, los compuestos se eluyen con una mejor resolución, por lo que el ajuste del modelo y su capacidad de predicción mejora, aumentando la importancia relativa del descriptor correspondiente al número de átomos carbonos en detrimento del número de anillos bencénicos. En cambio, al disminuir el tamaño de partícula de la columna de separación cromatográfica y trabajar con sistemas de UHPLC, al reducir mucho el tiempo de

cromatograma, se pierde capacidad de predicción del modelo. Así, si la eficacia del sistema cromatográfico es muy elevada y/o el tiempo de retención de los compuestos disminuye mucho, es indispensable tener una elevada precisión de los resultados experimentales para que el modelo de predicción sea suficientemente eficaz.

- Los descriptores escogidos para describir la separación de los HAPs por HPLC también son aplicables cuando estos compuestos se separan por cromatografía de gases. Aunque por HRGC, la importancia relativa del descriptor correspondiente al número de átomos de carbono aumenta hasta el 95%, en detrimento de los otros dos descriptores. Cabe destacar, que el número de átomos de carbono es una propiedad que está ligada con la masa molecular del compuesto y, en consecuencia, con su punto de ebullición (propiedad que se había considerado en el Capítulo I Apartado 3.3 para justificar el orden de elución de los HAPs en dicho sistema cromatográfico. Esto dificulta la asignación de los valores de $\log k'$ para los isómeros, disminuyendo la capacidad de predicción de estos compuestos.
- Cuando el modelo se aplica a la familia de los nitro-HAPs (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos con un grupo nitro en su estructura), los tres descriptores que describen la separación de los HAPs por cromatografía de gases son insuficientes y se debe incorporar un nuevo descriptor en el modelo, el momento dipolar. De esta manera, se consigue mejorar el modelo de ajuste y diferenciar entre isómeros de posición del grupo nitro.

A partir de los resultados obtenidos queda claro que los modelos propuestos son capaces de devolver valores de tiempos de retención aceptables para moléculas de la misma familia que no han sido previamente incluidas en el modelo. De esta manera se cumpliría el objetivo de poder ampliar el número de compuestos de la misma familia que pueden ser determinados con este determinado sistema cromatográfico. Sin embargo, es importante tener en cuenta que los modelos, no son capaces de predecir tiempos de retención de moléculas por extrapolación y, en ocasiones, el mismo error del ajuste, puede provocar que alguna de las moléculas altere su orden de elución.

***CAPITULO III.
DETERMINACIÓN DE HAPs EN
MUESTRAS DE AIRE AMBIENTE**

El aumento de la presencia de los HAPs en el medio ambiente junto a sus propiedades como POPs, realza la importancia del control de esta familia de contaminantes en el aire ambiente. Por esta razón, en el año 2004, esta familia de compuestos se incluye en la Directiva 2004/107/CE del Parlamento y del Congreso de la Unión Europea, *relativa al arsénico, el cadmio, el mercurio, el níquel y los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el aire ambiente*. Esta directiva fue transpuesta el año 2007, a nivel estatal, en el Real Decreto 812/2007.

Según indica la directiva, los datos científicos evidencian que estos compuestos son cancerígenos y genotóxicos para el ser humano. Así, con el pretexto de reducir al mínimo los efectos perjudiciales para la salud y el medio ambiente, propone fijar unos valores objetivo²² para Arsénico, Cadmio, Níquel y para la familia de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, utilizando el benzo(a)pireno (BaP) como indicador de riesgo cancerígeno de este grupo de contaminantes. Así, fija en 1 ng/m³ el valor objetivo para el BaP y propone controlar el contenido de benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(j)fluoranteno, indeno(123-cd)pireno y dibenzo(ah)antraceno.

En ese momento, la directiva reconoce que no se disponen de métodos normalizados ni nacionales ni internacionales, para la determinación de los contaminantes indicados en el aire ambiente e insiste en la necesidad de trabajar al respecto. Es por esta razón, y a raíz de la entrada en vigor del Real Decreto 812/2007, que el *Departament de Medi Ambient i Habitatge* de la *Generalitat de Catalunya* (DMAH) propone a IQS, el desarrollo y optimización de un procedimiento para la determinación de los HAPs incluidos en la directiva, en muestras de aire ambiente. A partir de este momento, la Sección de Cromatografía del IQS, dentro del entorno de la presente tesis, empieza un trabajo exhaustivo centrado en esta familia de contaminantes. A partir de este momento, IQS cuenta con varios contratos de concesión directa y varios obtenidos a partir de concurso público, relacionados con el análisis de HAPs en muestras de inmisiones atmosféricas captadas en diferentes poblaciones del territorio catalán.

Actualmente, el Real Decreto 102/2011, de 28 de enero, modificado por la Directiva 2015/1480 de 28 de agosto de 2015 establece, entre otros aspectos, el marco legislativo para la determinación de Arsénico, Cadmio, Níquel, Plomo e Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en aire ambiente. En esta nueva revisión, se establecen los métodos de referencia para la medición de algunos de los contaminantes especificados. Así, para la medición de las concentraciones de los HAPs indica la Norma UNE-EN 15549:2008. Sin embargo, el Real Decreto permite la utilización de cualquier otro método del que se pueda demostrar que proporciona resultados equivalentes a los métodos citados en la directiva.

²² Valor objetivo: es la concentración en el aire ambiente fijada, para evitar, prevenir y reducir los efectos perjudiciales en la salud humana y el medio ambiente en su conjunto, que debe alcanzarse, en la medida de lo posible, durante un determinado periodo de tiempo. (Directiva 2004/107/EC)

Teniendo en cuenta la necesidad legal del control de los HAPs en el aire ambiente, en este capítulo, se desarrolla el procedimiento para la determinación de los 7 HAPs indicados en la directiva en muestras de aire ambiente. La puesta a punto se realiza aprovechando las muestras que el DMAH proporcionadas a IQS.

Además, se plantea la conveniencia de acreditar, según la Norma ISO 17025:2005, el procedimiento de análisis de HAPs de las muestras manuales obtenidas de los sensores integrados en la *Xarxa de Vigilancia i Previsió de la Contaminació Atmosfèrica de Catalunya (XVPCAC)*, ampliando el alcance del expediente, ya en vigor para IQS-PEINUSA (Expediente nº 196/LE344), relacionado con los ensayos del sector medioambiental.

Así, se decide acreditar la determinación de BaP según la norma de referencia UNE-EN 15549:2008 y los otros seis HAPs, según el procedimiento interno desarrollado. Para ello, es imprescindible introducir los requerimientos de la norma en el procedimiento de trabajo y ampliar las actividades de control continuo del procedimiento para asegurar su correcto funcionamiento en cada serie de análisis. A parte, como requisito de acreditación, es necesario que el procedimiento esté validado y que tenga estimada la incertidumbre asociada a los resultados. Además, es imprescindible introducir una serie de actividades en el funcionamiento habitual del laboratorio que hacen referencia al aseguramiento de la calidad del resultado, entre las que se destacan, el uso regular de materiales de referencia y la participación en ensayos de intercomparación o programas de ensayos de aptitud. Así, en este capítulo, también se desarrollarán todas estas actividades de control del procedimiento que han sido necesarias para poder llevar a cabo su acreditación.

Con este procedimiento, se han analizado los HAPs de aproximadamente unas 800 muestras captadas desde noviembre de 2009 a marzo de 2012. El volumen de muestras analizadas ha permitido disponer de suficientes datos como para poder estudiar los resultados obtenidos, teniendo en cuenta, tanto factores ambientales estacionales como posibles fuentes emisoras de los contaminantes.

Así, en este capítulo se incluye tanto el desarrollo del procedimiento propuesto para la determinación de HAPs en muestras de aire ambiente, como las actividades llevadas a cabo para su acreditación por la Norma ISO 17025:2005 (validación, cálculo de incertidumbre y actividades de control del procedimiento). Finalmente, se presenta un estudio de los resultados obtenidos al analizar las muestras correspondientes a los sensores integrados de la XVPCAC entre los años 2009 y 2012.

1. EL MATERIAL PARTICULADO COMO MATRIZ DE ESTUDIO.

Según el Real Decreto y, consecuentemente la directiva de referencia, el método para la medición de la concentración de los HAPs (benzo(a)pireno) en el aire ambiente se basará en el **muestreo PM10 manual**.

Según el RD, las PM10 (*Particulate Matter*) se pueden definir como las partículas que pasan a través del cabezal de tamaño selectivo, definido en el método de referencia para el muestreo y la medición PM10 de la norma UNE-EN 12341, para un diámetro aerodinámico de 10 μm con una eficiencia de corte del 50%. (Real Decreto 812/2007)

En general, son aquellas partículas sólidas o líquidas de polvo, cenizas, hollín, partículas metálicas, cemento o polen, dispersas en la atmósfera, y cuyo diámetro aerodinámico varía entre 2,5 y 10 μm . Están formadas, principalmente, por compuestos inorgánicos como silicatos o aluminatos, metales pesados entre otros, y material orgánico asociado a partículas de carbono (hollín).

Las fuentes de emisión de estas partículas pueden ser tanto móviles como estacionarias, destacando que un 78% de la cantidad total emitida de PM10 procede del polvo en suspensión existente en la atmósfera. La industria, la construcción y el comercio con un 7,6% y el transporte rodado con un 6,5%, representan otros focos de contaminación de especial relevancia. Como fuentes minoritarias de contaminación, es importante señalar que el 3,7% del total, procede de quemas agrícolas y un 3,3% es de origen doméstico. (Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes de España., 2015)

La exposición prolongada o repetitiva a las PM10, puede provocar efectos nocivos en el sistema respiratorio de la persona. Debido a su tamaño, se pueden clasificar como partículas torácicas, ya que pueden penetrar hasta las vías respiratorias bajas y no logran atravesar los alveolos pulmonares, quedando retenidas en la mucosa que recubre las vías respiratorias superiores. Éstas son menos nocivas que las partículas PM2.5 (tamaño inferior a 2,5 μm), que al tener menor tamaño, son partículas respirables que pueden penetrar hasta las zonas de intercambio de gases del pulmón.

La mayoría de estas partículas PM10 precipitan en la tierra, provocando una capa de polvo en la superficie que puede afectar seriamente a la salud, tanto de los organismos terrestres como de los acuáticos.

Por estas razones, el material particulado en sí mismo, se considera un contaminante atmosférico y su control está regulado. Debido a la heterogeneidad de la mezcla de especies que lo forman, el parámetro que se controla es la concentración en masa del material particulado en el aire ambiente, en concreto, en la legislación actual sobre la calidad del aire (RD 102/2011), existen valores límite y objetivo de protección de la salud para las fracciones PM10 y PM2.5.

El método de referencia para la determinación de los niveles de PM10 y PM2.5 es el gravimétrico. Este método consiste en el muestreo del aire ambiente durante 24 horas a un caudal fijo (función del tipo de captador), que se hace pasar a través de un filtro donde se retienen las partículas. Un cabezal de corte selecciona la fracción de material particulado que interese (PM10, PM2.5, entre otras). Restando el peso del filtro inicial al del después del muestreo y dividiéndolo por el volumen total del muestreo, se obtiene la concentración de partículas ($\mu\text{g}/\text{m}^3$). Las especificaciones concretas y detalladas de todo el proceso de medida, aparecen en dos normas UNE-EN europeas: UNE-EN 12341:1999 (fracción PM10) y UNE-EN 12907:2006 (fracción PM2.5).

Los filtros que se utilizan para realizar la captación, son filtros de fibra de cuarzo de diferentes medidas, en función del tipo de captador utilizado.

Al margen de los parámetros PM10 y PM2.5, como se ha comentado, la legislación establece valores límite para metales y para el benzo(a)pireno (HAP) cuyas concentraciones deben ser calculadas tras la captación PM10, mediante el análisis de los filtros que incluyen esta fracción del material particulado. Cabe destacar, que una vez realizado el control gravimétrico del contenido de material particulado (ensayo no destructivo), el filtro puede ser utilizado, bien para la determinación de los metales o para la de los HAPs, ya que ambos análisis son de tipo destructivo.

- **¿Por qué se determinan los HAPs en la fracción particulada PM10?**

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, como se ha comentado, son contaminantes que están presentes en todos los compartimentos atmosféricos: en el aire (aerosoles) en el agua o en el suelo. Los HAPs de tres o más anillos aromáticos tienen una baja solubilidad en agua y presión de vapor. Por ello, se pueden encontrar en el aire ambiente tanto en la fase gaseosa como asociados a las partículas y su distribución está muy ligada a las condiciones atmosféricas (temperatura y humedad). Así, compuestos como el fenantreno y el fluoranteno se encontrarán principalmente en la fase gas (por lo que no se determinarán), mientras que los compuestos más pesados (de más de cuatro anillos aromáticos fusionados), considerados poco volátiles, se encontrarán, casi en su totalidad, adsorbidos a las partículas. Es por esta razón, que la directiva de referencia indica que la caracterización de los HAPs en el aire ambiente viene determinada por los HAPs más pesados de los 16 EPA-HAPs, a partir del BaA, descartando el criseno y el benzo(ghi)perileno, pero introduciendo el benzo(j)fluoranteno.

Como los HAPs son contaminantes generados principalmente durante la combustión incompleta de la materia orgánica (como carbón, derivados del petróleo y madera), estos compuestos semivolátiles quedarán adheridos a las partículas que se emiten en este tipo de emisiones que suelen ser partículas de polvo, hollín, entre otras, que tienen un tamaño entre 2,5 y 10 μm . Es por esta razón, que se ha decidido determinar los HAPs en la fracción particulada PM10.

No está legislado la determinación de los HAPs en partículas más finas, como las PM_{2.5}, pero eso no significa que no se puedan encontrar también este tipo de contaminantes.

2. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO INICIAL.

Inicialmente, se realiza una búsqueda bibliográfica exhaustiva relacionada con el análisis de HAPs en muestras de aire.

Se encuentran tres procedimientos publicados por la NIOSH (*The National Institute for Occupational safety and Health*). Aunque son procedimientos antiguos (datan de 1994 – 1998), utilizan como sistema de captación tanto filtros como tubos de adsorbente, por lo que se pueden utilizar como referencia, especialmente en la parte de extracción.

- *Method 5515: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by GC* (1994)
- *Method 5800: Polycyclic aromatic compounds, total (PACs)* (1998)
- *Method 5506: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by HPLC* (1998)

La US EPA (*Environmental Protection Agency*) también cuenta con procedimientos para la determinación de HAPs. Dispone de procedimientos generales como el método 8100, que se centra principalmente en la separación cromatográfica, el método 8270C, donde se determinan no sólo HAPs sino también otros compuestos semivolátiles como pesticidas y el método 8310 donde se incluye la determinación de HAPs pero en muestras de agua. Estos procedimientos son, igual que los de la NIOSH, bastante antiguos por lo que la parte de separación cromatográfica queda desfasada. Además, de estos tres procedimientos, la EPA también dispone de un compendio de métodos para la determinación de contaminantes orgánicos del aire ambiente (1999), entre los que se incluye la determinación de HAPs. Este es un procedimiento que hace referencia tanto a captaciones con filtros, como con resinas de poliuretano, como con adsorbentes tipo Tenax® o XAD-2®. En este caso, se propone una extracción Soxhlet durante 2 horas con una mezcla de dietiléter/hexano 10% (v/v), seguida de una purificación con una columna de sílica gel, y posterior análisis del extracto por GC-MS. (EPA/625/R-96/010b, 1999)

Además de los documentos especificados, en el año 2001, aparece un *Position Paper “Ambient air pollution by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons”*, donde se incluye una tabla resumen de los métodos de análisis que se utilizan en diferentes países de Europa para la determinación de HAPs en el aire ambiente [Tabla 98]. De esta manera, es posible tener una idea general de los procedimientos que existían hasta el momento y que se han utilizado como referencia para el desarrollo del procedimiento llevado a cabo. (Working group on PAH, 2001)

Tabla 98. Resumen de los métodos de análisis que se utilizan en diferentes países de Europa para la determinación de los HAPs en el aire ambiente. (Working group on PAH, 2001)

| País | Extracción | Purificación | Análisis cromatográfico |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------|
| UK | Soxhlet con hexano tolueno diclorometano (DCM) | Columna (sílica o alúmina) | HPLC-UV HPLC-FLU HRGC-MS |
| Finlandia | Soxhlet | Extracción L-L (DMSO) Columna (sílica o alúmina) | GC-MS |
| Austria | Soxhlet con hexano dietiléter | Columna (sílica o alúmina) | GC-FID GC-MS |
| España | Soxhlet con ciclohexano DCM DCM/acetona | Columna (sílica o alúmina) | GC-MS |
| Grecia | Soxhlet con hexano ciclohexano Ultrasonidos con ciclohexano DCM | Extracción L-L (DMF/agua) Columna (sílica o alúmina) | GC-FID GC-MS HPLC-FLU |
| Dinamarca | Soxhlet con tolueno | Columna (sílica o alúmina) | GC-FID GC-MS |
| Francia | Soxhlet con DCM ASE con DCM | ---- | HPLC-UV HPLC-FLU |
| Bélgica | Ultrasonidos con DCM | ---- | HPLC-FLU |

Sin embargo, si se considera como referencia la entrada en vigor del RD 812/2007 (inicio de la puesta a punto del procedimiento), se puede destacar un procedimiento CEN del año 2006 y una norma UNE-ISO 16362:2006, también del mismo año. Ninguno de estos dos procedimientos, han sido referenciados en la directiva 2004/107/CE, ya que son posteriores.

El procedimiento CEN (*European Committee for Standardization*), “*Air Quality- Standard method for the measurement of the concentration of benzo[a]pyrene in ambient air*”, es un procedimiento muy general pero incluye unas pautas claras para la determinación de BaP en muestras de aire ambiente (CEN/TC 264/WG 21 N 127, 2006). Igual que se proponía en el procedimiento de la EPA del 1999, para la determinación de HAPs, se incluye una etapa de extracción seguida de una purificación, acabando con un análisis del extracto por una técnica cromatográfica. A título informativo, propone alternativas para llevar a cabo cada una de las etapas propuestas. En la [Tabla 99], se adjuntan las opciones tanto de extracción, como de purificación, como de análisis cromatográfico.

Tabla 99. Resumen de las etapas propuestas por el método (CEN/TC 264/WG 21 N 127, 2006) para la determinación de HAPs en el aire ambiente (carácter informativo).

| ETAPA | Método |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| EXTRACCIÓN | Reflujo con tolueno |
| | Soxhlet con hexano/acetona (1:1) hexano/dietiléter (1:1) |
| | Microondas con hexano/acetona (1:1) |
| | Ultrasonidos con tolueno |
| | <i>Accelerated Solvent Extraction</i> con tolueno |
| PURIFICACIÓN | SPE (cartuchos de extracción en fase sólida) sílica gel cianopropilsilano |
| ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO | HPLC-FLU con Columna RP18 Cuantificación con Patrón externo o Patrón interno (HAP metilado o halogenado, ej. 6-metilcriseno) |
| | GC/MS con 95% metil-5% fenilpolisiloxano |
| | Sistema analizador de iones Cuadrupolo simple (modo SIM) Ion trap (modo DIM) |
| | Cuantificación con Patrón externo o Patrón interno (HAP deuterado) |

Por otro lado, la norma UNE-ISO 16362:2006, describe la “*Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en fase particulada por cromatografía líquida de alta resolución*”. Esta norma, especifica los procedimientos de muestreo, purificación y análisis para la cuantificación de HAPs de baja volatilidad (unidos a partículas) en el aire ambiente. Describe el procedimiento de muestreo y análisis por HPLC-FLU. Propone una etapa de extracción, bien con Soxhlet, con ultrasonidos o ASE pero siempre trabajando con tolueno como disolvente. No recomienda purificación, pero en el caso de realizarla, propone trabajar con columnas de sílica gel. Los extractos propone analizarlos por HPLC-FLU.

Teniendo en cuenta todos los procedimientos consultados, y especialmente los más actuales, se procede a la optimización del procedimiento para la determinación de HAPs en muestras de aire ambiente.

Es importante destacar, que a pesar de que existen varias alternativas de procedimiento en lo que hace referencia a la preparación de la muestra, la mayoría son métodos abiertos que ofrecen varias alternativas, por lo que será indispensable llevar a cabo la optimización y la posterior validación del procedimiento para poder asegurar la calidad de los resultados obtenidos.

Cabe destacar, que en el año 2008, después de ya haber realizado la optimización de la preparación de la muestra, aparece la norma UNE-EN 15549:2008, como método estandarizado para la determinación de BaP en muestras de aire ambiente. Este procedimiento se referencia en el RD 102/2011, pero permite la utilización de cualquier otro método siempre que esté validado y proporcione resultados equivalente al del método citado.

3. DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE HAPs EN MUESTRAS DE AIRE AMBIENTE (filtros de partículas PM10).

Se procede a la puesta a punto del procedimiento para la determinación de los siete HAPs incluidos en el RD 812/2007 (benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(j)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(ah)antraceno e indeno(123-cd)pireno) en filtros de partículas PM10.

Es importante tener en cuenta que el rango de trabajo debe incluir el valor objetivo para el BaP (1 ng/m³).

Se optimizará tanto la toma de muestra del filtro, a la hora de llevar a cabo el procedimiento, como el método de extracción de los HAPs del filtro mediante un disolvente orgánico. La etapa de toma de muestra de aire queda fuera del alcance de IQS, por lo que en este trabajo no se considerará. Se trabajará con las muestras captadas con los sistemas de captación de la *Xarxa de Vigilància de Previsió de la Contaminació Atmosfèrica de la Generalitat de Catalunya*.

Como técnica cromatográfica de análisis del extracto, en este caso, se propone trabajar por HPLC-FLU, ajustando ligeramente el método cromatográfico puesto a punto en el primer capítulo, para que los compuestos a estudio se eluyan lo antes posible, y reducir al máximo el tiempo de cromatograma. En este caso, se considera imprescindible trabajar con dobles parejas de longitudes de onda, para cada uno de los compuestos a estudio, para poder asegurar la identificación, no sólo por tiempo de retención sino también por relación de señales a las dos parejas de longitudes de onda de detección, para poder salvar posibles interferencias de matriz. Cabe destacar, que gracias a trabajar de esta forma con el detector de fluorescencia, no se considera necesario realizar la etapa de purificación. De manera, que el extracto orgánico que se obtiene de la extracción sólido-líquido, se concentra, se reconstituye con un volumen determinado de acetonitrilo y se inyecta directamente en el equipo de HPLC-FLU.

Realmente, en este caso, se podría trabajar con los métodos puestos a punto tanto por HRGC-MS (EI/SIM) como por UHPLC-FLU. Sin embargo, se descarta el método de HRGC-MS debido a que la parte cromatográfica es mucho más lenta. Además, necesita trabajar con patrón interno y aumentar los controles de patrón entre la serie para poder compensar la falta de estabilidad del propio detector a lo largo de largas series de análisis. Además, la principal ventaja que ofrece el detector espectrómetro de masas, la identificación de los compuestos, se ha conseguido

realizar con el detector de fluorescencia gracias a la relación de señales entre las dos parejas de longitudes de onda escogidas para cada compuesto.

Se podría pensar para futuras revisiones del procedimiento, aplicar el método de UHPLC para la determinación de estos compuestos en muestras de aire ambiente y acortar, aún más, el tiempo de cromatograma. Sin embargo, en este caso, tampoco se considerará imprescindible porque la etapa limitante de este procedimiento se encuentra en la preparación de la muestra.

3.1. TOMA DE MUESTRA PARA EL ANÁLISIS DE LOS HAPs. MANIPULACIÓN Y CONSERVACIÓN

En lo que hace referencia a las muestras disponibles, se ha trabajado con los filtros de partículas PM10 proporcionados por el DMAH de la Generalitat de Catalunya (actualmente, *Departament de Territori i Sostenibilitat* (DTES)). Así, se dispone de dos tipos de filtros de fibra de cuarzo: filtros redondos de unos 15 cm de diámetro y filtros rectangulares de 25 x 20 cm, a través de los cuales se hace pasar un volumen de aire muestreado promedio de unos 1000 m³/día (superior a 540 m³ y 1224 m³, para filtros redondos y cuadrados, respectivamente) [Figura 66].

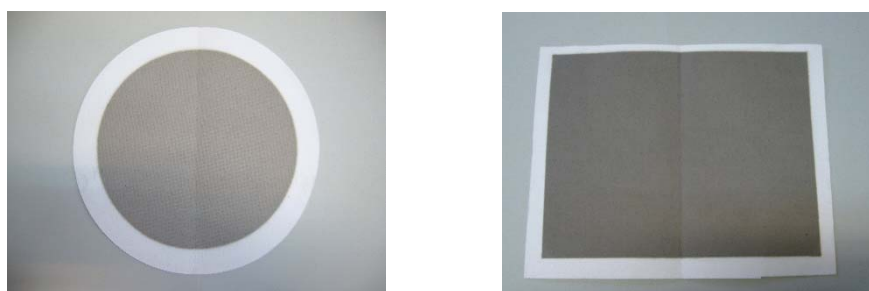


Figura 66. Ejemplos de filtros muestreados, redonda (izquierda) y cuadrado (derecha), proporcionados por DMAH

Como se puede observar, los filtros tienen una zona central que ha retenido las partículas y una zona exterior, por la que no circula aire consecuencia de la colocación de los filtros en los cabezales de los sistemas de muestreo.

Estos filtros deberían recibirse preferiblemente doblados (con las partículas en la zona interior), protegidos de la luz y se deberían mantener a temperatura ambiente o inferior, hasta el momento de su análisis.

Inicialmente, una vez los filtros han sido utilizados y antes de realizar el análisis de los HAPs (o metales), se suele determinar el contenido de material particulado. Con la finalidad de cumplir la norma UNE-EN 12341:1999, en IQS, los filtros de partículas PM10, se mantienen en una cámara de acondicionamiento a temperatura y humedad controlada ($20 \pm 1^\circ\text{C}$ y $50 \pm 5\%$, respectivamente), donde se acondicionan durante 48 horas. Después, se sigue el procedimiento

gravimétrico descrito en la norma de referencia para conocer el contenido de partículas que tiene el filtro. Una vez finalizado este proceso, el filtro ya puede ser utilizado para la determinación bien de HAPs o bien de metales, ambos procedimientos destructivos. De manera, que para realizar las dos medidas se tomarán filtros diferentes.

Los filtros que se utilizarán para la determinación de los HAPs, en principio, se han conservado dentro del sobre donde se recibe la muestra después de su captación, doblados con las partículas en el interior, en la misma cámara de acondicionamiento. Es importante no desdoblar el filtro, manipularlo lo menos posible y mantenerlo protegido de la luz.

Se recomienda que el análisis se realice como máximo dos meses después del muestreo, ya que los HAPs pueden degradarse en el filtro durante el periodo de captación y durante el posterior almacenamiento. Esto es importante, especialmente, para el benzo(a)pireno y el dibenzo(ah)antraceno, ya que de los HAPs a estudio son los más reactivos.

Toma de muestra para el análisis de los HAPs

Para la toma de muestra se plantean dos posibilidades, trabajar con todo el filtro o tomar un trozo del mismo para poder realizar repeticiones, si se considerara necesario.

En los inicios de este trabajo, se propone trabajar con un trozo del filtro, exactamente con una cuarta parte de los filtros redondos y una octava parte de los cuadrados. Esto es posible ya que se ha comprobado que el filtro es homogéneo si se corta de forma radial (coeficientes de variación inferiores al 5%). Sin embargo, no se ha comprobado la homogeneidad del filtro si este se corta de diferente manera.

Para ello, se corta la parte externa del filtro que no contiene partículas, procurando no tocar la parte muestreada para evitar pérdidas de partículas innecesarias. Como medida de seguridad a la hora de cortar el filtro, se recomienda trabajar con mascarilla para polvo y guantes. Una vez se dispone de la zona donde están las partículas, se pesa el filtro entero. Posteriormente, se corta en fracciones de forma radial (en cuartos los filtros redondos y en octavos los filtros cuadrados), y se toma una de las fracciones que es la que se utiliza para realizar el análisis.

Durante la optimización del procedimiento de extracción se ha trabajado, en todos los casos, con fracciones de filtro, con la finalidad de poder realizar repeticiones. Sin embargo, en el momento en el que se propone trabajar con muestras reales, se decide utilizar los filtros enteros, ya que se evita:

- La manipulación del filtro antes de la toma de muestra que puede llevar a pérdidas de partículas o contaminaciones cruzadas.
- La pesada de la fracción que se toma para realizar el análisis, ya que el resultado es sobre filtro entero.
- La pequeña variabilidad que pueda existir en caso de que la adhesión de los HAPs a las partículas del filtro no sea del todo homogénea.

- Tener que reconstituir a volúmenes pequeños antes de inyectar el extracto por HPLC-FLU, para poder llegar a los límites de especificación exigidos por la legislación. Simplificando y acelerando la etapa de reconstitución.

Como punto negativo, en este caso, es que las muestras serán únicas, por lo que no será posible ni la repetición ni la adición, sobre el mismo filtro.

3.2. MÉTODO CROMATOGRÁFICO.

El análisis del extracto obtenido después de la extracción de los compuestos de interés con disolvente orgánico, se realizará por HPLC-FLU. En este caso, se ha trabajado con el sistema Alliance 2690 o 2695, con detector de fluorescencia de longitud de onda variable modelo 2475, ambos de casa comercial *Waters*. Para la adquisición de los datos, y para el tratamiento de la información, se ha trabajado con el software de *Waters, Empower* en sus versiones 2.0 y 3.0.

El método cromatográfico utilizado, está basado en el que se propone en el Capítulo I de la presente tesis, para la separación de los 16 EPA-HAPs y el B₁F por HPLC-FLU [Tabla 26]. Sin embargo, como sólo se quieren determinar los HAPs menos volátiles, que se eluyen, fundamentalmente, en la zona de máximo poder eluotrópico, se decide comenzar el gradiente con una mayor proporción de componente orgánico. Así, los compuestos de interés se eluyen antes y se consigue acortar el tiempo de cromatograma. En la [Tabla 100], se presentan las condiciones de separación propuestas para el análisis de los extractos procedentes de muestras de aire ambiente.

Tabla 100. Condiciones cromatográficas para la separación de los 7 HAPs de interés en muestras de aire ambiente (BaA, BbF, BkF, B₁F, BaP, DiBaH_A e IP)

| Condiciones de separación de los 7 HAPs en muestras de aire ambiente por HPLC: | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Columna | Pursuit 3 PAH (100 X 4,6 mm, 3 µm) Pre-columna: Pursuit 3 PAH <i>metaguard</i> 3,0 mm |
| Volumen de inyección | 20 µL |
| Temperatura columna | 28 ± 1 °C |
| Flujo | 1 mL/min |
| Eluyente | [A] Agua MilliQ; [B] Acetonitrilo (ACN) |
| Gradiente elución - 1 (Patrones/blancos) | 0-1,5 min: [A] 20% [B] 80% 9- 15 min: [A] 0% [B] 100% - Curva: 6 (lineal) 15-20 min: [A] 20% [B] 80% (<i>Estabilización en condiciones iniciales</i>) |
| Gradiente elución - 2 (Muestras y blancos de campo) | 0-1,5 min: [A] 20% [B] 80% 9- 18 min: [A] 0% [B] 100% - Curva: 6 (lineal) 18-22 min: [A] 20% [B] 80% (<i>Estabilización en condiciones iniciales</i>) |
| Tiempo de cromatograma | 20 min Para patrones y blancos 22 min: Para muestras y blancos de campo |

En la [Tabla 101], se presentan los tiempos de retención y tiempos de retención relativos al BaP de los compuestos a estudio.

Tabla 101. Tiempos de retención y tiempos de retención relativos al BaP (trR (BaP)), en las condiciones de separación presentadas en la [Tabla 100]

| Compuesto (HAP) | Tiempo de retención (min) | trR (BaP)* |
|----------------------|---------------------------|------------|
| Benzo(a)antraceno | 5,96 | 0,62 |
| Benzo(j)fluoranteno | 7,57 | 0,79 |
| Benzo(b)fluoranteno | 8,01 | 0,84 |
| Benzo(k)fluoranteno | 8,73 | 0,91 |
| Benzo(a)pireno | 9,59 | 1,0 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 10,54 | 1,10 |
| Indeno(123-cd)pireno | 11,96 | 1,25 |

*trR (BaP): tiempo de retención relativo al BaP

Las diferencias de las condiciones propuestas para la separación de los 7 HAPs pesados en muestras de aire ambiente, respecto a las que se proponían para la separación de los 16 EPA-HAPs con BjF presentadas en el Capítulo I [Tabla 26], son las siguientes:

- Se trabaja con pre-columna, con la finalidad de proteger y alargar la vida de la columna teniendo en cuenta que los extractos no se purificarán.
- Se propone trabajar con una temperatura de columna de 28°C en lugar de 30°C y flujo 1,0 mL/min en lugar de 1,5 mL/min, para mejorar la separación de los compuestos que se eluyen en la zona de máximo poder eluotrópico.
- Se inicia el gradiente de elución con una mayor proporción de componente orgánico. Así, en lugar de iniciar la elución de los compuestos con una proporción de agua MilliQ del 46% se inicia con una proporción de tan solo un 20%. De esta manera, se consigue avanzar los HAPs más pesados.
- Sin embargo, no se consigue disminuir el tiempo total del cromatograma ya que, es imprescindible, especialmente cuando se trabaja con muestras y blancos de campo, alargar el tiempo en que el gradiente permanece al 100% de acetonitrilo. De esta manera, la columna se limpia en cada inyección de los compuestos menos polares, que puedan estar presentes en la muestra. Si no se toma esta precaución, se observa un aumento progresivo de la línea de base a lo largo de la serie de análisis. De manera, que imposibilita la determinación de los picos de los HAPs en los patrones y muestras donde éstos se encuentran más diluidos.

Para que la parte cromatográfica se lleve a cabo sin incidencias, se deben tomar las siguientes precauciones de trabajo:

- La columna y la pre-columna se han de limpiar cada 16 muestras inyectadas (cada 2 series de análisis), para evitar desestabilización de la línea de base. Para ello, se desconecta la pre-columna y se coloca después de la columna en sentido inverso al habitual durante la inyección. Se desconecta del detector y se hace pasar acetonitrilo 100% durante un tiempo aproximado de 2 horas, antes de volver a realizar una serie de análisis. De esta manera, se consigue alargar tanto la vida de la columna como de la pre-columna, y evitar desestabilización de la línea de base entre la serie de análisis.

- Con la finalidad de asegurar una adecuada repetibilidad de inyección, antes de iniciar la secuencia, se debe dejar estabilizar el sistema (con el detector encendido), haciendo circular la fase móvil en condiciones iniciales (80:20 ACN/agua MilliQ) durante un mínimo de dos horas.

En la [Tabla 102], se presentan las condiciones de detección propuestas para la determinación de los 7 HAPs a estudio, con el detector de fluorescencia. Como se puede observar, se incluyen dos métodos (método 1 y método 2), lo que implicará realizar dos inyecciones con el mismo método de separación, pero variando las condiciones de detección. Además, no se trabaja con ventanas de detección sino con canales independientes. De esta manera, se evita que se pierdan picos de interés si se desplazan los tiempos de retención por efecto matriz o por ligeros cambios en la temperatura de la columna. En este caso, no es necesario limitar el número de canales, como sucedía cuando se trabajaba con UHPLC, ya que la velocidad de adquisición es suficiente para definir correctamente los picos. Como hay que realizar dos inyecciones en dos métodos diferentes, se repite un canal de longitudes de onda (se escoge el 296/405 nm donde se detectan 5 de los compuestos a estudio), lo que permitirá asegurar la repetibilidad de inyección.

Tabla 102. Condiciones de detección para la determinación por fluorescencia de los 7 HAPs de interés en muestras de aire ambiente (BaA, BbF, BkF, BjF, BaP, DiBahA e IP)

| Condiciones de detección de los 7 HAPs en muestras de aire ambiente por Fluorescencia | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Método 1: | CANAL A: $\lambda_{\text{excitación}}=285 \text{ nm} / \lambda_{\text{emisión}}=400 \text{ nm}$ [DiBahA] CANAL B: $\lambda_{\text{excitación}}=293 \text{ nm} / \lambda_{\text{emisión}}=485 \text{ nm}$ [BbF e IP] CANAL C: $\lambda_{\text{excitación}}=296 \text{ nm} / \lambda_{\text{emisión}}=405 \text{ nm}$ [GRUPO**] CANAL D: $\lambda_{\text{excitación}}=318 \text{ nm} / \lambda_{\text{emisión}}=510 \text{ nm}$ [BjF e IP] |
| Método 2: | CANAL A: $\lambda_{\text{excitación}}=290 \text{ nm} / \lambda_{\text{emisión}}=430 \text{ nm}$ [BaA, BbF, BkF y BaP] CANAL B: $\lambda_{\text{excitación}}=295 \text{ nm} / \lambda_{\text{emisión}}=500 \text{ nm}$ [BbF, BjF e IP] CANAL C: $\lambda_{\text{excitación}}=296 \text{ nm} / \lambda_{\text{emisión}}=405 \text{ nm}$ [GRUPO**] CANAL D: $\lambda_{\text{excitación}}=380 \text{ nm} / \lambda_{\text{emisión}}=500 \text{ nm}$ [BjF e IP] |

**GRUPO: BaA, BbF, BkF, BaP, DiBahA

En la [Tabla 103], se incluye un resumen de las parejas de longitudes de onda escogidas para la determinación de los 7 HAPs a estudio en muestras de aire ambiente. Como se puede observar, se incluye una pareja de longitudes de onda principal, y como mínimo, una pareja de longitudes de onda secundarias o de cualificación. Para los compuestos, BbF, BjF e IP, se incluye más de una pareja de longitudes de onda secundarias ya que, son los compuestos que presentan menos señal, y según los estudios realizados, son los que pueden presentar más interferencias de matriz.

Tabla 103. Longitudes de onda de excitación y emisión seleccionadas para trabajar con los diferentes HAPs a estudio.

| Compuesto (HAP) | Principal o <i>target</i> | Secundaria o de cualificación |
|----------------------|------------------------------------------|-------------------------------|
| | $\lambda_{excitación}/\lambda_{emisión}$ | |
| Benzo(a)antraceno | 296/405 | 290/430 |
| Benzo(b)fluoranteno | 296/405 | 290/430 – 293/485 – 295/500 |
| Benzo(k)fluoranteno | 296/405 | 290/430 |
| Benzo(a)pireno | 296/405 | 290/430 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 296/405 | 285/400 |
| Benzo(ghi)perileno | 296/405 | 285/400 |
| Indeno(123-cd)pireno | 318/510 | 293/485 – 295/500 |
| Benzo(j)fluoranteno | 318/510 | 380/500 – 295/500 |

En la [Figura 67] y la [Figura 68], se presentan los cromatogramas correspondientes a un patrón de 80 ng/mL, preparado en acetonitrilo por dilución a partir del patrón conjunto de 16 EPA-HAPs de 100 mg/L (PAH MIX 9) y el patrón concentrado de BjF.

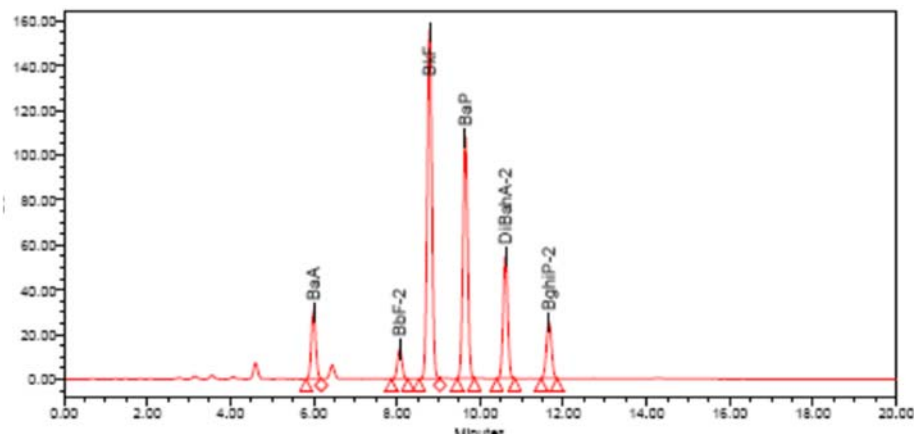


Figura 67. Cromatograma obtenido al analizar un patrón de 80 ng/mL de HAPs. Pareja de longitudes de onda principales para BaA, BbF, BkF, BaP y DiBaA (296/405).

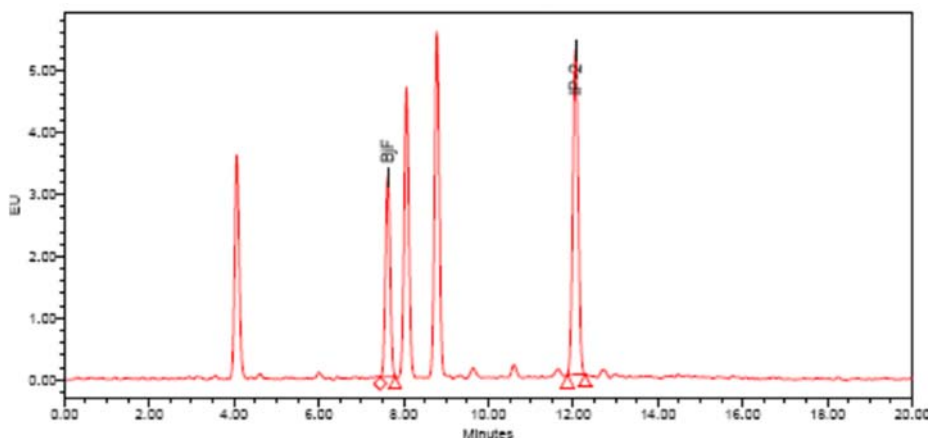


Figura 68. Cromatograma obtenido al analizar un patrón de 80 ng/mL de HAPs. Pareja de longitudes de onda principales para BjF e IP (318/510).

Con los estudios realizados con patrones, se puede decir que la respuesta de los 7 HAPs es lineal en el margen de concentraciones de 10 ng/mL a 1000 ng/mL (disolución inyectada), y los límites de detección son del orden de 1 ng/mL para BaA, BbF, BkF, BaP y DiBaH_A y de unos 2 ng/mL para B_JF e IP.

3.3. DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LOS HAPs.

Se ensayan diferentes métodos de extracción: ultrasonidos, Soxhlet y ASE. En una etapa inicial, y debido a la no disponibilidad del sistema ASE en la Sección de Cromatografía del IQS, se inicia la puesta a punto utilizando los métodos de extracción disponibles, es decir, ultrasonidos y Soxhlet. Posteriormente, y debido al elevado número de muestras a analizar, se decide adquirir un equipo ASE para poder transferir, en el periodo exigido según concurso, los resultados de los HAPs correspondientes a las muestras de la XVPCA.

3.3.1. Extracción con ultrasonidos y Soxhlet.

Inicialmente se trabaja con ultrasonidos y Soxhlet como sistemas de extracción. En los dos casos, se optimiza el disolvente y el tiempo de extracción.

Para realizar estos ensayos, se ha trabajado con muestras de la XVPCA, proporcionadas, en ese momento, por el *Departament de Medi Ambient* de la Generalitat de Catalunya. Alguno de los filtros disponibles, tanto redondos como cuadrados, se cortan de forma radial, tal y como se ha indicado anteriormente, y cada uno de los trozos se utiliza para ensayar las diferentes condiciones de trabajo. En algunos de los casos, se adiciona una concentración de HAPs sobre el filtro que equivale en el extracto a 100 ng/mL (100 µL de patrón conjunto de HAPs de 1000 ng/mL preparado en acetonitrilo). Para valorar las mejores condiciones, se comparan los resultados de los diferentes HAPs obtenidos y se observan los perfiles cromatográficos a nivel de interferencias de matriz.

Trabajando con **ultrasonidos como sistema de extracción** se han ensayado diferentes disolventes: acetona, hexano, diclorometano y mezclas acetona: hexano (1:1) y (1:5). En todos los casos, se coloca 1/8 de un filtro cuadrado en un erlenmeyer de 100 mL, cortado a trozos cuadrados y se cubren con disolvente (aproximadamente unos 30-40 mL). El erlenmeyer se tapa con tapón esmerilado y se introduce en un baño de ultrasonidos, evitando que el agua se caliente en exceso, adicionando hielo en el baño. Con cada uno de los disolventes ensayados, se realizan 5 extracciones sucesivas de 30 minutos del mismo trozo de filtro. Cada extracción, se analiza de forma independiente previa concentración y reconstitución a 1 mL con acetonitrilo.

Del estudio de la extracción con ultrasonidos se extrae que:

- El disolvente que ofrece mejores resultados, tanto en lo que hace referencia al rendimiento de extracción, como en los perfiles cromatográficos, es la acetona. Además, teniendo en cuenta los disolventes ensayados, además de ser de los más económicos, no es un compuesto clorado y gracias a su bajo punto de ebullición, la concentración a sequedad es rápida.
- Si se consideran los resultados de las cinco extracciones realizadas, la concentración de los HAPs en la cuarta extracción ya es inferior al límite de detección (1 ng/mL en disolución). Además, en la tercera extracción, la concentración es inferior al 5% de la concentración inicial.

Así, para realizar la extracción por ultrasonidos, se propone utilizar acetona como disolvente y realizar tres extracciones del mismo filtro juntando los extractos obtenidos.

En el caso de utilizar el **Soxhlet como sistema de extracción**, también se ensayan diferentes disolventes: tolueno, acetona y una mezcla de acetona: hexano (1:5). En este caso, se escogen estos disolventes porque cubren un amplio rango de polaridades y son los disolventes propuestos en bibliografía con este sistema de extracción. Se descarta trabajar con disolventes tanto organoclorados (diclorometano) como con éteres (dietiléter), debido a sus efectos sobre el medio ambiente y sobre la salud humana.

En este caso, se fija una velocidad de extracción de 10 ciclos/hora y se controla el tiempo necesario para que la extracción de los HAPs sea completa. Así, se toman extractos parciales después de una hora de extracción y transcurridas dos, cuatro y ocho horas.

Con la finalidad de comprobar que el tiempo de extracción es suficiente incluso cuando la concentración de HAPs es elevada, también se trabaja con muestras adicionadas.

Después de los ensayos realizados, se concluye que:

- El disolvente que ofrece los mejores resultados de extracción con el sistema Soxhlet, también es la acetona. En la [Figura 69], se presentan los valores de recuperación obtenidos para el BaP.

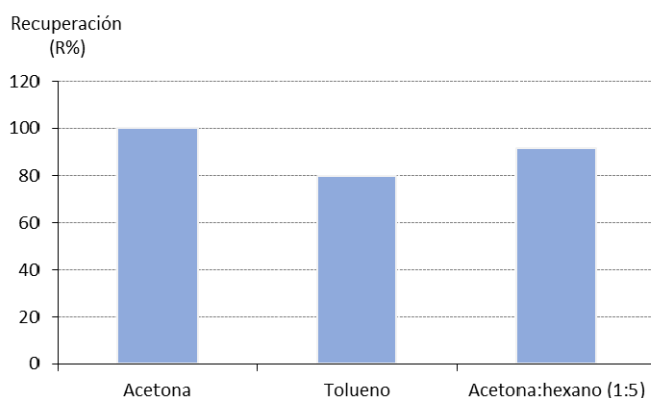


Figura 69. Ensayos con Soxhlet: comparación de disolventes. Valores de recuperación para el BaP.

- El tiempo de extracción en caliente se fija en 8 horas a una velocidad de 10 ciclos/hora, ya que transcurrido este tiempo la extracción se considera completa. En la [Figura 70], se presenta el porcentaje de concentración respecto al valor inicial adicionado en las fracciones tomadas trascurridas 1, 2, 4 y 8 horas desde el inicio del proceso de extracción, para el BaA, BaP y el DiBahA. Como se puede observar, la mayor cantidad de HAPs extraída, se obtiene transcurrida tan solo una hora del inicio del proceso de extracción. A partir de las dos horas, el porcentaje de HAPs que queda en el extracto es inferior al 4%, pero es importante ver que aunque para el DiBahA la bajada observada a las 4 y las 8 horas es insignificante, para el BaP la extracción es mucho más lenta y se necesitan de las 8 horas para conseguir que la concentración en el extracto sea inferior al 2%.

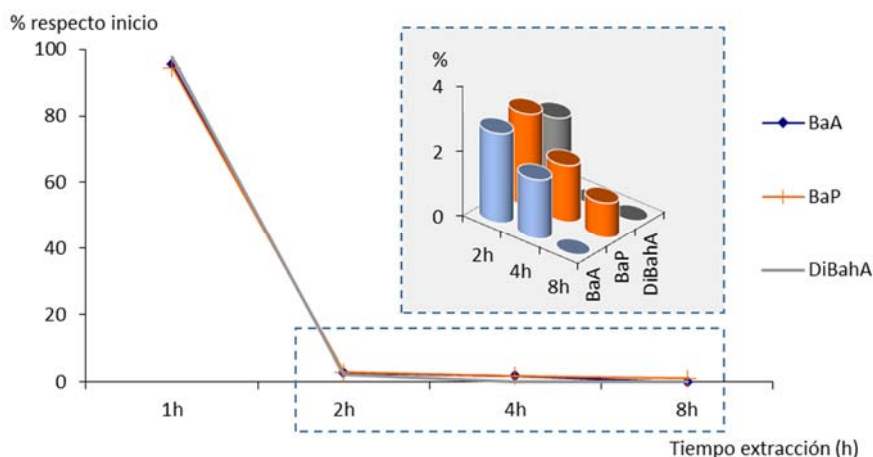


Figura 70. Estudio del tiempo de extracción por Soxhlet. Porcentaje de BaA, BaP y DiBahA que queda en el extracto, respecto a la cantidad inicial.

En la [Tabla 104], se presenta de forma resumida, las condiciones de extracción de los HAPs en filtros de partículas PM10, propuestas tanto por ultrasonidos como con Soxhlet.

Tabla 104. Condiciones de trabajo propuestas para la extracción de los HAPs en muestras de aire ambiente, tanto por ultrasonidos como por Soxhlet

| Condiciones | Ultrasonidos | Soxhlet |
|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Disolvente | Acetona | Acetona |
| Tiempo de extracción | 30 min (cada ¼ filtro redondo) | 8 horas en caliente (10 ciclos/hora) + 12 horas en frío (cada ¼ filtro redondo) |
| Número de extracciones | 3 | 1 |
| Volumen de disolvente / muestra | 30 -40 mL / preparación x 3 extracciones 90 – 120 mL cada fracción del filtro | 80 mL – 160 mL cada fracción de filtro |
| Tiempo total extracción /muestra | 0,5 horas X 3 = 1,5 horas /muestra | 8 + 12 horas (una noche) = aprox. 20 horas/muestra |
| Productividad máxima (en el Laboratorio de Cromatografía del IQS) | 15 muestras /semana | 30 muestras/semana |

En las condiciones propuestas, se analiza por triplicado el mismo filtro tanto por ultrasonidos como por Soxhlet. En cada caso, se toma 1/8 de filtro cuadrado. En la [Figura 71], se presentan los resultados obtenidos en ng/m³ y en la [Tabla 105], los coeficientes de variación obtenidos.

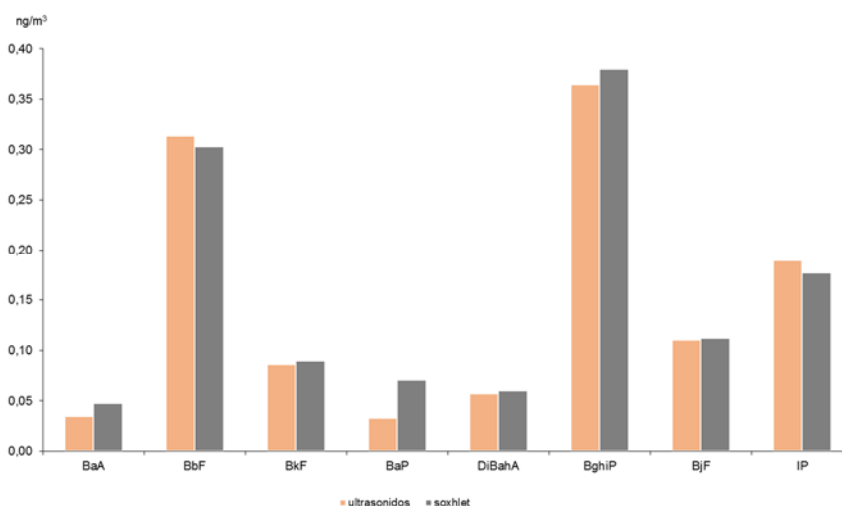


Figura 71. Resultados promedio de la concentración de HAPs de tres trozos de un mismo filtro cuadrado (1/8), los cuales han sido extraídos tanto por ultrasonidos como con Soxhlet.

Tabla 105. Coeficientes de variación (CV%) al analizar los tres trozos (n=3) de un mismo filtro cuadrado (1/8), después de realizar la extracción por ultrasonidos y Soxhlet

| Compuesto (HAP) | Ultrasonidos | Soxhlet |
|----------------------|--------------|---------|
| | CV% (n=3) | |
| Benzo(a)antraceno | 9,4 | 2,0 |
| Benzo(j)fluoranteno | 7,7 | 4,4 |
| Benzo(b)fluoranteno | 8,7 | 4,0 |
| Benzo(k)fluoranteno | 8,2 | 4,9 |
| Benzo(a)pireno | 35 | 12 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 16 | 5,4 |
| Indeno(123-cd)pireno | 9,1 | 3,8 |

Si se comparan los dos procedimientos de extracción propuestos en esta etapa inicial, se prefiere trabajar con la extracción con Soxhlet ya que, aunque los resultados obtenidos para la mayoría de los HAPs a estudio son comparables, los resultados individuales para BaP y los coeficientes de variación para todos los HAPs, son mejores. Además, la productividad con Soxhlet, considerando el sistema montado en la Sección de Cromatografía, es mayor que con ultrasonidos, a pesar de que tanto el volumen de disolvente como el tiempo necesario por muestra sean mayores.

Por esta razón, se decide estudiar la precisión y la exactitud del procedimiento cuando se utiliza Soxhlet como sistema de extracción. En este caso, se aprovecha la muestra disponible del primer ejercicio de intercomparación llevado a cabo en ese periodo de tiempo. La muestra está formada por restos de muestras reales de filtros de fibra de cuarzo procedentes de la fracción PM10 del material particulado de distintas estaciones integradas correspondientes a la Unidad Metropolitana de Barcelona, que habían sido triturados y homogeneizados, convenientemente.

Para el estudio de precisión se preparan seis muestras y se sigue el procedimiento descrito de extracción por Soxhlet. El extracto se analiza por HPLC-FLU, siguiendo el método cromatográfico propuesto [página 227]. Los coeficientes de variación obtenidos se presentan en la [Tabla 106].

Tabla 106. Resultados del estudio de la precisión del procedimiento (n=6), cuando se utiliza Soxhlet como método de extracción.

| Compuesto (HAP) | Concentración promedio (µg/g) | CV% (n=6) |
|----------------------|-------------------------------|-----------|
| Benzo(a)antraceno | 0,14 | 3,2% |
| Benzo(j)fluoranteno | 0,12 | 1,9% |
| Benzo(b)fluoranteno | 0,29 | 2,3% |
| Benzo(k)fluoranteno | 0,08 | 4,2% |
| Benzo(a)pireno | 0,13 | 2,2% |
| Dibenzo(ah)antraceno | 0,04 | 9,7% |
| Indeno(123-cd)pireno | 0,14 | 2,4% |

Todos los coeficientes de variación obtenidos son inferiores al 10%. Si se calcula con la función de Horwitz²³, el límite aceptado de coeficiente de variación teniendo en cuenta la concentración de trabajo, se obtiene un coeficiente de variación del 16%, por lo que los resultados cumplirían con este criterio de aceptación.

Para determinar la exactitud, se realizan adiciones sobre la muestra a dos niveles de concentración (1 µg/g y a 3 µg/g), teniendo en cuenta que el nivel en los HAPs en la muestra es bajo (0,03 a 0,3 µg/g). Cada una de las adiciones se prepara por triplicado. En la [Tabla 107], se presentan los valores de recuperación promedio obtenidos, para cada uno de los analitos de estudio, a cada uno de los niveles estudiados. La recuperación a nivel bajo (sin adición) se calcula considerando como valor real, el valor de consenso del ejercicio de intercomparación (BaA: 139,4 ng/g; B_jF: 112,7 ng/g; B_bF: 280,7 ng/g; B_kF: 79,8 ng/g; BaP: 130,1 ng/g; DiBahA: 32,6 ng/g e IP: 139,9 ng/g).

Tabla 107. Resultados del estudio de la exactitud del procedimiento (recuperación R%), cuando se utiliza Soxhlet como método de extracción.

| Compuesto (HAP) | R% Nivel bajo (sin ADD) | R% Nivel 1 µg/g | R% Nivel 3 µg/g |
|----------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|
| Benzo(a)antraceno | 100,4 | 102,1 | 96,9 |
| Benzo(j)fluoranteno | 106,5 | 92,0 | 90,9 |
| Benzo(b)fluoranteno | 103,3 | 114,2 | 99,2 |
| Benzo(k)fluoranteno | 100,2 | 85,7 | 89,0 |
| Benzo(a)pireno | 99,9 | 76,5 | 76,9 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 122,6 | 72,9 | 82,4 |
| Indeno(123-cd)pireno | 100,0 | 58,9 | 71,8 |

Los valores de recuperación obtenidos oscilan entre el 60 y el 115%, siendo los valores más bajos los que se obtienen para el IP. Teniendo en cuenta que los niveles de los HAPs en el extracto son del orden de los 100 ng/mL cumplen con los criterios de aceptación establecidos por la AOAC²⁴, en función de la concentración.

Aunque los valores de precisión y exactitud obtenidos con Soxhlet pueden ser aceptables, es importante tener en cuenta que el tiempo de dedicación para cada muestra es muy largo (20 horas de extracción, más el tiempo de concentración y el tiempo cromatográfico). Esto limita claramente el aumento de productividad en lo que hace referencia al número de muestras. Es por esta razón, que se plantea ensayar la extracción con el sistema ASE, como alternativa al Soxhlet, en el caso de disponer de muchas muestras a analizar en el laboratorio.

²³ Cálculo del CV de precisión según ecuación de Horwitz: $CV_R(\text{Horwitz})\% = 2^{(1-0,5\log C)}$ donde C es la concentración (10^{-6}g/g)

²⁴ AOAC: Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC, 1993; Huber, 1999)

3.3.2. Extracción con ASE (*Accelerated Solvent Extraction*).

El sistema ASE (*Accelerated Solvent Extractor*) es un sistema automático para extraer compuestos orgánicos de matrices sólidas o semisólidas. El sistema aprovecha la combinación de trabajar a una elevada temperatura y presión para incrementar la eficiencia del proceso de extracción. El resultado es una reducción tanto del tiempo de extracción por muestra como del disolvente utilizado.

En este caso, en la Sección de Cromatografía del IQS, se dispone de un sistema ASE 350 de la casa comercial *Dionex*. Cabe destacar, que en el mercado hay pocos equipos que permitan hacer este tipo de extracción acelerada con disolvente de forma robusta, por lo que éste es uno de los equipos más comercializados para este uso.



Figura 72. Sistema ASE 350 de Dionex (equipo para realizar la extracción acelerada con disolvente).

En el sistema ASE 350, el método extracción consiste en que la celda donde se encuentra la muestra se llena con el disolvente y ésta se mantiene a una temperatura y presión elevadas durante un tiempo determinado (tiempo de extracción estático o *static time*). Posteriormente, el extracto orgánico se recoge en un vial, para poder ser concentrado o purificado.

Cabe destacar, que la automaticidad del equipo permite trabajar en serie, programando una secuencia que incluirá tanto el orden de extracción de las celdas, como el método, como el vial donde se debe recoger el extracto orgánico resultante.

El sistema ASE, como aportación externa, necesita únicamente nitrógeno seco o aire. En el ASE 350 que se tiene en la Sección de Cromatografía del IQS se trabaja con nitrógeno seco. Éste realiza una función neumática, tanto para el movimiento de las celdas (entrada y salida del horno), como para ayudar a introducir y extraer el disolvente del interior de la celda. La presión

necesaria es de unos 150 psi (de 140 a 200 psi, según el fabricante). Un insuficiente aporte de nitrógeno, por ejemplo, por un agotamiento parcial de la bombona, provoca errores, tanto con las celdas (que pueden quedar dentro del horno) como de conseguir la presión de trabajo dentro de la celda. Por lo que su control es imprescindible para un buen funcionamiento del equipo.

La inversión económica inicial está condicionada por la adquisición del sistema y por la compra de las celdas de extracción. Éstas tienen un coste elevado pero, cabe destacar, que con un buen mantenimiento de las mismas, no tienen por qué renovarse a lo largo de la vida del equipo. Es importante destacar, que el nivel de productividad del equipo dependerá, en gran parte, de la cantidad de celdas disponibles (la bandeja de celdas del equipo ASE 350 permite la colocación de hasta 24 celdas).

En la Sección de Cromatografía del IQS, se dispone de un total de 12 celdas de acero inoxidable de 33 mL. Existen celdas de otros materiales (como de zirconio) y de otros volúmenes (10 mL, 22 mL, 66 mL y 100 mL). Las celdas de zirconio, son más caras y permiten trabajar con matrices parcialmente básicas o ácidas, por lo que no han sido necesarias para este trabajo. En lo que hace referencia al volumen de la celda, se escoge aquella que tiene suficiente capacidad para albergar la totalidad de los filtros cuadrados, sin tener un volumen sobrante demasiado grande, ya que de él depende, en gran parte, el volumen de disolvente de extracción requerido.

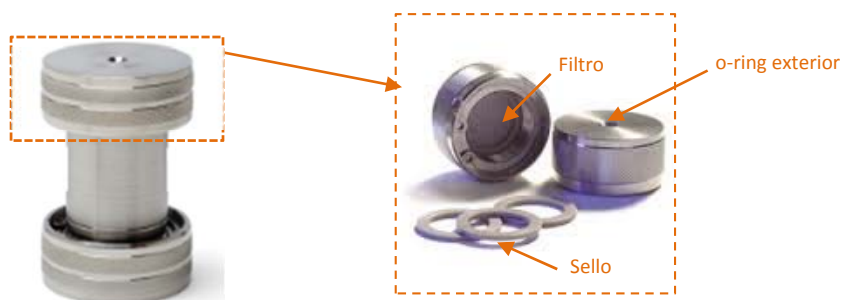


Figura 73. Celda de extracción de acero inoxidable de 33 mL, para ASE 350 de Dionex. Incluye ampliación con las roscas que permiten el cierre hermético de la celda, donde se reconoce el filtro (también de acero inoxidable), un sello de PEEK™ y los o-rings exteriores de Teflon®.

Para poder asegurar unos buenos resultados con el sistema ASE, además de optimizar los parámetros relacionados con el método de extracción, es imprescindible asegurar un buen montaje de la celda.

Es importante asegurar que el contacto entre el disolvente y la muestra sea el mayor posible. Para ello, es imprescindible que la muestra se encuentre perfectamente troceada y compactada. Sólo de esta manera, es posible asegurar que no se forman caminos de extracción preferentes que provocarían una extracción no homogénea. Normalmente, para mejorar el contacto disolvente-matriz, la muestra se suele mezclar con un agente dispersante y/o desecante.

Éste debe ser un material inerte, típicamente se utiliza tierra de diatomeas. De esta manera, se impide que las partículas de muestra se compacten entre sí. Además, si el material mezclado con la muestra tiene un carácter desecante, permite captar la humedad de la muestra y ayuda a que el disolvente orgánico, muchas veces inmiscible en agua, entre en contacto con las partículas de muestra. En el caso de trabajar con tierra de diatomeas, aunque no es capaz de eliminar una gran cantidad de agua, facilita el contacto del disolvente con la muestra y, como la extracción se realiza a temperatura alta, también favorece la extracción del agua presente en la muestra quedando ésta en el vial colector. Si se considera necesario, se puede adicionar sulfato de sodio para secar el extracto orgánico antes de la concentración.

Preparación de la muestra. Montaje de la celda de extracción

A pesar de que el fabricante insiste en que el sentido de colocación y de montaje de las celdas es indiferente, la experiencia indica que es preferible que las celdas se coloquen y se monten siempre en el mismo sentido. De esta manera, es posible controlar más fácilmente el desgaste de los *o-rings* externos y la limpieza interna de las celdas. Por eso, en este caso, se aprovecha la señal de medio círculo que hay gravada en el cuerpo de la celda (◡), que se mantendrá siempre en el mismo sentido de extracción.

Como agente dispersante, en este caso, se utilizará tierra de diatomeas²⁵ que se mezclará con el filtro perfectamente troceado.

Así, para el montaje de las celdas, se seguirán los siguientes pasos [Figura 74]:

- Con la celda abierta sólo por la parte superior, se introducirá un filtro de celulosa que se colocará plano en la parte inferior, a través del cual se filtrará el extracto orgánico obtenido, después de la elución y evitará que se obture el filtro que ya tiene la propia celda.
- Se adicionará una espátula de agente dispersante (tierra diatomeas) para aislar la matriz muestra del filtro.
- La muestra (filtro de partículas PM10, entero o una fracción), se corta en el interior de la celda a trozos lo más pequeños e iguales posibles. Se prefiere cortar directamente en el interior del cuerpo de la celda para evitar pérdidas del material particulado. Poco a poco, el filtro troceado, se va mezclando con el agente dispersante. Es muy importante que el filtro quede muy bien cortado y perfectamente mezclado con el agente dispersante.
- Una vez el filtro está todo cortado en el interior de la celda, se compacta con la ayuda de la herramienta que incluye el equipo para este fin.
- Si la celda no queda completamente llena, acabar de completar el volumen restante con tierra de diatomeas. Se debe tener en cuenta, que si queda volumen vacío en la celda, se obtendrá un mayor volumen de extracto orgánico en el vial colector.

²⁵ Tierra de diatomeas, HYDROMATRIX de la casa comercial *Varian* (referencia; 198003).



Figura 74. Sentido y montaje de la celda del ASE con la muestra.

Método de extracción

Antes de iniciar el procedimiento de extracción, se deben realizar los siguientes pasos preliminares:

- Preparación de las muestras en las celdas que formarán la secuencia.
- Numerarlas y colocarlas en posiciones correlativas en la bandeja de celdas.
- Colocar los viales colectores numerados y tapados con séptums de un solo uso, en la bandeja correspondiente. Es importante que tanto las celdas como los viales estén correlacionados, para evitar errores a la hora de localizar los extractos correspondientes a cada una de las muestras.
- Colocar las botellas de aclarado, donde se expulsa el disolvente de limpieza y purga de sistema, tanto antes de iniciar la secuencia como entre extracciones.
- Colocar en el compartimiento correspondiente, el disolvente o disolventes de extracción que se van a utilizar a lo largo de la secuencia. El equipo permite trabajar tanto con disolventes puros como con mezclas de 2 o 3 disolventes, que se puede realizar en continuo.
- Crear los métodos de extracción que se utilizarán en la secuencia.
- Crear y lanzar la secuencia de trabajo.

El método de extracción consta de los siguientes pasos:

PASO 1: Carga de la celda.

La celda y los viales colectores giran y se colocan en la posición especificada en la secuencia y la aguja perfora el septum del vial colector. Cuando el horno se encuentra a la temperatura del método de trabajo, carga la celda.

PASO 2: Llenado de la celda.

Con la válvula estática que comunica la celda con el vial colector cerrada, se inicia el bombeo del disolvente al interior de la celda donde se encuentra la muestra, de manera que ésta se va llenando. Cuando la presión en su interior es de aproximadamente 1500 psi, el flujo de disolvente se para. Si la presión durante el llenado llega a 1700 psi, se abre la válvula estática y parte del disolvente del interior de la celda se vacía en el vial colector, hasta conseguir la presión deseada.

PASO 3: Calentamiento y tiempo de extracción estático (static time).

La celda llena de disolvente a una presión de 1500 psi dentro del horno a la temperatura seleccionada, se mantiene durante un periodo de tiempo determinado (*static time*) que se especifica en el método. Durante este periodo, la válvula estática de conexión con el vial colector permanecerá cerrada siempre y cuando la presión no aumente hasta los 1700 psi. Si es así, puede que se abra ligeramente para compensar esta presión.

PASO 4: Vaciado de la celda

Una vez finalizado el tiempo de extracción, la válvula estática que conecta la celda con el vial colector se abre y el disolvente se vacía en el vial colector. Se puede vaciar la totalidad del disolvente o una fracción, si se quiere realizar más de un ciclo de extracción sin cambiar completamente el disolvente del interior de la celda. Aunque en el último ciclo de extracción el vaciado siempre es completo.

PASO 5: Purga de la celda

Una vez vaciada la celda de disolvente, se hace pasar nitrógeno a presión a través del sistema con la válvula estática, que comunica celda y vial colector, abierta. De manera, que se consigue acabar de arrastrar todo el disolvente, tanto el que queda en el interior de la celda como en el sistema.

PASO 6: Descarga de la celda

Después de la purga, se abre la válvula de seguridad que despresuriza el sistema, y la celda se saca automáticamente del horno y se vuelve a colocar en su posición inicial dentro de la bandeja de celdas.

Así, conocido paso a paso el funcionamiento del método de extracción del sistema ASE 350, en la [Tabla 108], se especifican los parámetros más habituales que pueden considerarse a la hora de programar el método de extracción y que pueden ajustarse para asegurar un buen rendimiento. En la tabla, se especifican tanto los parámetros, como los valores que se pueden programar y los valores más habituales.

Tabla 108. Extracción ASE. Parámetros que forman parte del método de extracción, con su posible rango de trabajo y el valor o los valores por defecto.

| Parámetro | Función | Rango posible de trabajo | Valor por defecto |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Temperatura | Temperatura a la que se calentará la celda, durante el <i>static time</i> | 0 (off) a 200 (*)°C | 100°C |
| Calentamiento (Heat) | Tiempo estimado para conseguir el equilibrio térmico de la muestra. Depende y está fijado en función de la temperatura seleccionada | Depende de la temperatura | 40-100°C → 5 min 101-125°C → 6 min 126-150°C → 7 min 151-175°C → 8 min 176-200°C → 9 min |
| Static time | Duración del tiempo estático de extracción sólido-líquido en el interior de la celda | 0 a 2000 min | Entre 5 y 10 min |
| Ciclos | Número de veces que se repetirá la extracción (incluye el <i>static time</i> y el <i>rinse volume</i>) | 1 a 9 ciclos | 1 o 2 ciclos |
| Rinse volume | El volumen de disolvente que se extrae de la celda una vez finalizado el tiempo de extracción | 0 al 150% | 60 o 100% |
| Purge | El tiempo que la celda se purga con nitrógeno | 20 a 900 s | 20 a 60 s (celdas: 1 o 5 mL) 40 a 80 s (celdas: 10 o 22 mL) 70 a 110 s (celdas: 34 mL) 160 a 200 s (celdas: 66 mL) 250 a 290 s (celdas: 100 mL) |
| Solvent A, B o C | El disolventes o la relación de la mezcla de disolventes | ---- | ---- |

Teniendo en cuenta los parámetros del método de extracción con el sistema ASE, se procede a la optimización del método de extracción.

• **Optimización de la extracción de los HAPs con el sistema ASE.**

En este caso, la optimización del procedimiento de extracción se realiza antes de disponer del sistema ASE 350 en la Sección de Cromatografía del IQS, para poder valorar si los resultados de recuperación obtenidos son equivalentes a los que se habían obtenido con Soxhlet. Este estudio, se realiza en el Laboratorio de Aplicaciones de la casa comercial *Dionex*, en Barcelona.

Se propone trabajar con acetona como disolvente de extracción, a raíz de los resultados obtenidos tanto con ultrasonidos como con Soxhlet. Los ensayos, se centrarán en la optimización tanto de la temperatura como del tiempo de extracción estático y el número de ciclos.

Los ensayos se realizan con la misma muestra del ejercicio de intercomparación que se ha utilizado para estudiar la precisión y exactitud del método de extracción Soxhlet.

Se ensayan dos temperaturas (100 y 120°C) con un tiempo de extracción estático de 6 y 8 min, respectivamente. Además, de cada celda se realizan dos extracciones, tomando los extractos de la primera y la segunda extracción de forma independiente.

Después de los ensayos realizados, se concluye que:

- En los extractos correspondientes a la segunda extracción de las celdas, la concentración de los HAPs es del orden del 5%, respecto al contenido de HAPs en el extracto obtenido en la primera extracción. De manera, que aunque esta proporción es pequeña, se prefiere realizar dos ciclos de extracción sobre la misma celda y juntar los extractos.
- El aumento del tiempo de extracción estático no mejora de forma significativa la recuperación de los HAPs, pero los resultados son ligeramente mejores a 8 min que a 6 min.
- Si se comparan los resultados obtenidos a 100°C y a 120°C, aunque en todos los casos los valores de recuperación son superiores al 75%, los resultados son ligeramente mejores cuando se trabaja a la temperatura más alta. En estas condiciones, los valores de recuperación obtenidos son para el BaA del 99%, para el BaP del 83% y para el DiBaH del 90%. Cabe destacar, que aumentar más la temperatura no mejora los resultados obtenidos.

En la [Tabla 109], se presentan las condiciones de trabajo propuestas para realizar la extracción de los HAPs de los filtros de partículas PM10, con el sistema ASE 350 de *Dionex*.

Tabla 109. Condiciones de trabajo propuestas para la extracción de los HAPs en muestras de aire ambiente con el sistema ASE 350.

| Condiciones | ASE |
|---------------------|---------|
| Disolvente | Acetona |
| Temperatura | 120°C |
| Heat time | 6 min |
| Static time | 8 min |
| Ciclos | 2 |
| Rinse volume | 70% |
| Purge time | 100 s |

Teniendo en cuenta las condiciones de trabajo propuestas, la extracción de cada una de las muestras dura aproximadamente 30 minutos y se obtiene un volumen de disolvente de extracción de unos 45 mL. Así, queda claro, que se ha conseguido disminuir hasta en un 70% el volumen de disolvente consumido por muestra. Además, en lo que hace referencia al tiempo de extracción por muestra, se ha reducido de 20 horas/muestra a 30 min/muestra.

Si se valora la productividad con el sistema ASE se consigue aumentar. Sin embargo, se debe tener en cuenta que cuando se trabaja con Soxhlet las extracciones son largas pero se pueden realizar a la vez tantas como montajes se tengan disponibles. En cambio, con el sistema ASE, las extracciones se realizan de forma secuencial de manera que si se consideran 8 horas de extracción Soxhlet en caliente, se pueden realizar 16 muestras en continuo con el sistema ASE.

Teniendo en cuenta esta consideración, el material disponible y la limpieza, tanto de los Soxhlet como de las celdas, se puede decir que en la Sección de Cromatografía se ha conseguido doblar la productividad al trabajar con el sistema ASE, pasando de poder analizar unas 30 muestras/semana con Soxhlet a 60 muestras/semana con ASE.

Si se comparan los valores de recuperación obtenidos cuando el sistema de extracción utilizado es Soxhlet o ASE [Figura 75], se observa que para BaA, BaP y DiBaHA, los resultados son siempre ligeramente mejores cuando se trabaja con el sistema ASE, aspecto que también justifica el cambio a utilizar este sistema de extracción.

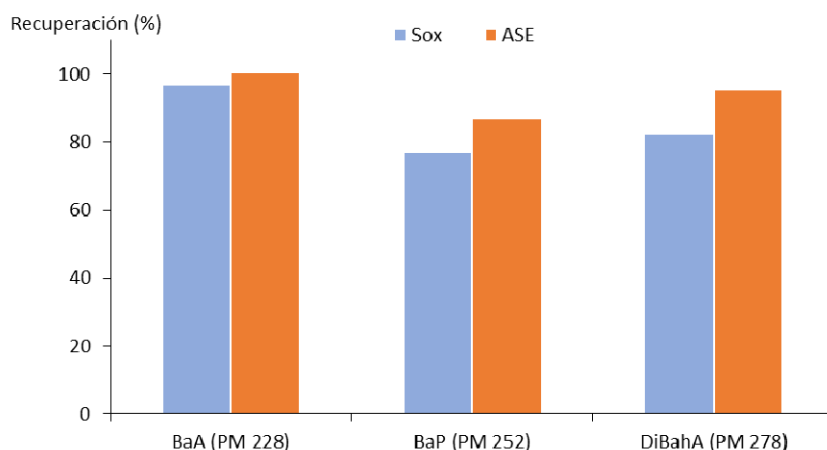


Figura 75. Comparación Soxhlet (azul) y ASE (naranja). Valores de recuperación obtenidos para BaA, BaP y DiBaH.

Por estas razones, se propone trabajar con el sistema ASE como método de extracción de los HAPs en muestras de aire ambiente.

- **Ventajas e inconvenientes de trabajar con el sistema ASE 350. Controles para su correcto funcionamiento.**

A continuación se indican las ventajas e inconvenientes que se han encontrado a la hora de trabajar con el sistema ASE 350 de *Dionex*, aprovechando la experiencia adquirida al analizar un gran volumen de muestras de aire ambiente para el *Departament de Medi Ambient* (actualmente DTES).

Se ha observado que el sistema ASE 350:

- Es un sistema robusto que permite trabajar con muchas muestras en continuo y requiere de muy poco mantenimiento. El principal control no está tanto en el equipo sino en las celdas, donde si es importante que los *o-rings* sellen perfectamente para asegurar que no hay pérdidas de presión no controladas durante la extracción.
- Permite aumentar la productividad gracias a que se disminuye mucho el tiempo de extracción por muestra, respecto a un sistema de extracción Soxhlet convencional.
- Permite disminuir el consumo de disolvente necesario para hacer la extracción de cada muestra y, consecuentemente, reduce también el tiempo de concentración posterior.

Como principales inconvenientes se puede destacar el coste del equipo. Su precio es equivalente al precio de un cromatógrafo de HPLC convencional con un detector tipo ultravioleta o DAD. Sin embargo, en este caso, no se necesita un gasto de mantenimiento anual. Por lo tanto, el uso de

este equipo está justificado cuando se dispone de un volumen importante de muestras que lo avalan.

Sin embargo, para conseguir trabajar convenientemente con el sistema ASE 350 de *Dionex*, es necesario tomar una serie de precauciones:

- *Limpieza de las celdas.*

Se debe conseguir que las celdas queden completamente limpias para evitar problemas de contaminaciones cruzadas. Inicialmente, las celdas se limpiaban simplemente desmontándolas completamente y sumergiéndolas en un baño con el disolvente de extracción, tal y como lo indicaba el fabricante. Pero se ha comprobado que esta limpieza es insuficiente, obteniéndose en muchas ocasiones blancos sucios con niveles de HAPs del orden de 10 ng/mL en el extracto inyectado. Por esta razón, se decide realizar una limpieza más exhaustiva. Se propone una limpieza en dos etapas:

- Una primera etapa equivalente a la propuesta por el fabricante pero sin desmontar completamente la celda, separando únicamente el cuerpo de las dos roscas.
- Una segunda etapa que consiste en limpiar la celda aplicando sobre ella el método de extracción. El único cambio que se realiza cuando se trata de la limpieza de las celdas, es que se reduce el número de ciclos de 2 a 1, de manera que el tiempo de extracción es ligeramente menor.

Con esta doble limpieza de las celdas, se consigue asegurar que en los blancos de proceso la concentración de HAPs es inferior a 3 ng/mL, después de haber extraído en la celda una concentración elevada de estos compuestos.

El principal problema que conlleva este tipo de limpieza es que se debe invertir un tiempo de extracción para la limpieza de las celdas (a considerar a la hora de valorar su productividad) y se debe gastar un volumen de disolvente equivalente al que se utiliza en la extracción de la muestra.

- *Orden en el manejo de las celdas y los viales colectores.*

Es muy importante ser ordenado en el manejo y control, tanto de las celdas como de los viales colectores. Cabe destacar, que ambos han de estar relacionados, normalmente se numera de forma idéntica la celda y el vial colector donde se depositará su extracto. Sólo si el orden es riguroso, se puede asegurar que no se darán problemas de desplazamiento de extractos ni confusiones innecesarias. Es muy importante que una vez finalizada la secuencia se revise el nivel de extracto obtenido para cada celda. En la secuencia, si el método de extracción es el mismo y todas las celdas estaban llenas, el volumen de extracción debe de ser equivalente. Volúmenes de extracto inferiores podrían indicar que la extracción de la celda no se ha realizado correctamente. En este caso, se propondría volver a realizar la extracción de la misma celda, juntando siempre los extractos. No se ha encontrado ninguna ocasión en que el extracto se haya depositado en un vial colector no indicado en la secuencia.

Si el extracto obtenido tiene un volumen muy superior al esperado, se podría pensar que se han juntado extractos, por lo que obligaría a eliminar la muestra.

Es importante tener en cuenta también, que en las secuencias en las que se incluye la limpieza de las celdas, al estar éstas vacías, el vial colector de 50 mL se suele llenar completamente. Por esta razón, puede aparecer algún error en el equipo, ya que éste tiene un sensor de volumen máximo para evitar que el extracto rebose del vial colector.

- *Control tanto los niveles de disolvente de extracción como de nitrógeno antes de iniciar una secuencia de extracción.*

El volumen de disolvente que se incluye en el equipo antes de iniciar la secuencia debe ser suficiente para realizar todas las extracciones incluidas en la secuencia. Se debe tener en cuenta, tanto el volumen de disolvente necesario por muestra como el volumen de purga (*rinse*) que se necesita tanto al inicio de la secuencia como entre muestras (si éste ha sido programado en la secuencia).

También es importante controlar la presión de nitrógeno disponible. Si ésta es inferior a 150 psi, pueden aparecer problemas con el sistema neumático y puede que la secuencia se pare de forma inesperada, dejando celdas en el interior del horno o dando problemas a la hora de hacer la purga inicial antes de comenzar el método de extracción.

- *Mantenimiento de las celdas.*

En muchas ocasiones, cuando no se consigue estabilizar la presión en el interior de una celda llena es debido a que los *o-rings* no sellan correctamente. Por esta razón, es necesario que se cambien cada cierto tiempo, se propone realizar el cambio aproximadamente cada 250 extracciones o cada cuando se observe este error.

3.3.3. Resumen del procedimiento de preparación de muestra para la determinación de HAPs en filtros de partículas PM10.

Después de los ensayos relacionados con la preparación de la muestra para la determinación de los HAPs en filtros de partículas PM10, se decide trabajar con el sistema ASE como método de extracción.

Para ello, se tomará preferiblemente la totalidad del filtro que se cortará en el interior de la celda de extracción de 33 mL y se mezclará, convenientemente, con tierra de diatomeas como agente dispersante.

Como disolvente de extracción, se propone utilizar acetona y se llevará a cabo con el sistema ASE. La extracción se realizará a 120°C con un tiempo estático de 8 min. Sobre cada celda, se realizarán dos ciclos de extracción, juntando los extractos en un mismo vial colector. En estas condiciones, el volumen de extracto obtenido será del orden de 45 mL.

El extracto orgánico que contiene los HAPs, no se purifica. Directamente, se procede a su concentración. En este caso, se aprovecha el evaporar *TurboVap*® para llevar el extracto a sequedad.

El sistema de evaporación *Turbovap*® II *Caliper-Zymark* permite la concentración de hasta 6 muestras a la vez, sin observarse problemas de contaminaciones cruzadas. Funciona con nitrógeno y las muestras están ligeramente sumergidas en un baño de agua a una temperatura controlada para acelerar la evaporación del disolvente. La mayor eficiencia en la concentración, se consigue gracias al movimiento en espiral con efecto cizalla que el gas tiene en el interior del tubo de muestra. Este movimiento está patentado y permite disminuir el tiempo de concentración hasta en un 60%, respecto a los sistemas de concentración convencionales como con Kuderna-Danish.

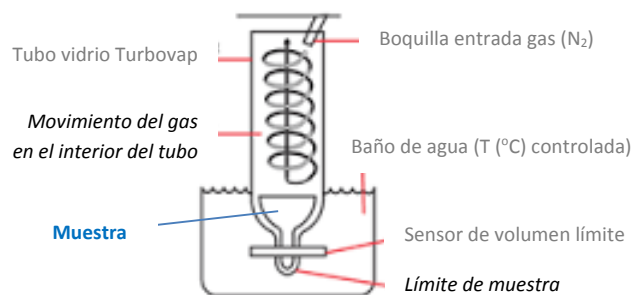


Figura 76. Esquema de funcionamiento del evaporador TurboVap II.

El extracto orgánico se concentra hasta sequedad controlando el punto final para evitar pérdidas por evaporación de los HAPs más volátiles. Posteriormente, se adicionan 2 mL de acetonitrilo en el mismo tubo de concentración, se introduce durante un minuto en un baño de ultrasonidos para que la parte de sólido que pueda haber quedado adherido a la pared del bulbo inferior quede totalmente disuelto en el disolvente de inyección. El extracto resultante se pasa a través de un filtro de membrana de 0,45 μm y el filtrado, se introduce directamente en el vial de inyector automático, para ser analizado por HPLC-FLU.

Teniendo en cuenta esta forma de preparación de la muestra y el límite de cuantificación que se tiene para los HAPs de estudio por HPLC-FLU en disolución inyectada (10 ng/mL para BaA, BbF, BkF, BaP y DiBahA; 15 ng/mL para BbF e IP), el rango inferior de trabajo será de 20 ng/filtro para BaA, BbF, BkF, BaP y DiBahA y de 30 ng/filtro para BbF e IP.

Si se considera que el volumen de muestreo promedio en los filtros disponibles es de 1000 m³, los límites inferiores de trabajo serán de 0,02 ng/m³ y 0,03 ng/m³, respectivamente. Estos valores son hasta 50 veces inferiores al valor objetivo para el BaP (1 ng/m³) que se propone en el Real Decreto, actualmente en vigor.

4. ACTIVIDADES RELACIONADAS CON EL CONTROL RUTINARIO DEL PROCEDIMIENTO.

En el procedimiento para la determinación de HAPs en muestras de aire ambiente, se incluyen una serie de controles rutinarios que aseguran su correcto funcionamiento. Éstos están relacionados con el control de los patrones de cuantificación y de los blancos tanto del material como de los reactivos utilizados. También se incluyen controles, tanto de la etapa de extracción (mediante el estudio de la eficiencia de la desorción) como de la etapa cromatográfica (calibración y el ensayo de idoneidad). Además, en las muestras, se incluye el control de interferencias de matriz, mediante la relación de las parejas de longitudes de onda de detección.

A continuación, se desarrolla más detalladamente como se llevan a cabo cada uno de estos controles.

- **Preparación y estabilidad de los patrones de cuantificación.**

La cuantificación de las muestras se realiza por patrón externo, utilizando el factor de respuesta promedio de cada uno de los 7 analitos a estudio, con patrones de concentraciones comprendidas entre 10 ng/mL y 1000 ng/mL, utilizando acetonitrilo como disolvente.

Para ello, se dispone del patrón conjunto concentrado (PAH MIX 9) de 100 mg/L que incluye los 16 EPA-HAPs, entre los que se incluyen los compuestos a estudio y un patrón puro de benzo(j)fluoranteno.

A partir del patrón sólido de B_jF se prepara una disolución madre de 100 mg/L, tomando 5,00 mg ($\pm 0,001$ mg) en un matraz de 50,0 mL y se enrasa con acetonitrilo.

A partir de estas dos disoluciones concentradas se preparan, controlando el volumen adicionado por pesada, los patrones diluidos de 1000, 400, 200, 80, 40 y 10 ng/mL, utilizando también acetonitrilo como disolvente. Estas seis disoluciones corresponden con los patrones de calibración.

Como se ha indicado en el apartado 1 del Capítulo I de la presente tesis (página 42), con los patrones se debe asegurar, que éstos estén bien preparados y que tanto las disoluciones compradas como las preparadas sean estables en su periodo de tiempo de conservación (1 mes). La metodología seguida en los dos casos, se incluye detalladamente en el Capítulo I, apartado 1.3.

- **Control de interferencias de procedimiento: material y reactivos.**

Antes de iniciar el proceso de extracción se debe asegurar que tanto el material como los reactivos no presentan interferencias.

Material de vidrio

El material de vidrio a utilizar (viales colectores o tubos de *TurboVap*[®]) se limpia, aclarándolo primero con agua, después con acetona y finalmente con hexano. Una vez escurrido, se introduce en una estufa a 300°C durante un mínimo de 3 horas.

Antes de considerar este material limpio y disponible para su uso en el análisis de muestras, se propone, primero tomar unos 45 mL de acetona y enjuagar los tubos de *TurboVap*[®] con los que se quiere trabajar. Posteriormente, en uno de los tubos, se concentra a sequedad y se reconstituye con 2 mL de acetonitrilo, como se realiza en el análisis de las muestras. Este extracto se inyecta normalmente como una muestra más.

Una vez asegurado que los tubos *TurboVap*[®] están limpios, se realiza el mismo procedimiento pero con los viales colectores. Para ello, se toman los viales a utilizar y se enjuagan también con 45 mL de acetona adecuada. Posteriormente, este volumen de acetona se concentra en un tubo de *TurboVap*[®] limpio, y una vez concentrado, se reconstituye con los 2 mL de acetonitrilo y también se inyecta en el cromatógrafo en las condiciones habituales de trabajo.

Los extractos obtenidos en los dos casos, deben de tener una concentración de cada uno de los HAPs a estudio inferior a 3 ng/mL.

Reactivos

Cada vez que se desprecinta una nueva botella de acetona (reactivo de extracción) y de acetonitrilo (disolvente de inyección), se debe de realizar el blanco de reactivo. En el caso de la acetona, se toman aproximadamente 45 mL y se concentran a sequedad en un tubo de *TurboVap*[®] limpio. El extracto se reconstituye con 2 mL de acetonitrilo y se inyecta como una muestra más. En el caso del acetonitrilo, se inyecta directamente en el cromatógrafo.

Para asegurar que los reactivos son adecuados para su uso, tanto el extracto de la acetona como el acetonitrilo, también deben tener una concentración de HAPs inferior a 3 ng/mL.

- **Control del procedimiento de extracción: blanco de filtro y eficiencia de desorción.**

Antes de la toma de muestra, es interesante valorar si los filtros de cuarzo que se van a utilizar presentan interferencias. Para ello, se toma un filtro blanco y se analiza como una muestra. Se asegura que no tiene interferencias y el lote de filtros es adecuado para el muestreo, si en el extracto obtenido la concentración de los HAPs es inferior a 3 ng/mL.

Una vez se asegura que un determinado lote de filtros se puede utilizar para el muestreo de los HAPs, se debe comprobar la eficiencia de la desorción.

Para ello se propone cada serie de muestras (máximo cada 20 muestras), verificar la eficiencia de la desorción, mediante la adición de filtros blancos en el laboratorio con una cantidad conocida de HAPs (nivel de adición 250 ng HAPs por filtro).

Para ello, en una celda de ASE, abierta sólo en la parte superior, se coloca un filtro de celulosa y una espátula de tierra de diatomeas. Una parte del filtro de cuarzo blanco, se corta en el interior del cuerpo de la celda y se mezcla con un poco de tierra. Se siembra la muestra con 500 µL de un patrón conjunto de 1000 ng/mL (calibración o control) de HAPs, preparado en acetonitrilo. Una vez adicionado el patrón se corta la parte del filtro que queda y se mezcla, cuidadosamente, con aproximadamente dos espátulas de tierra. Se prensa el contenido de la celda y se procede a su extracción. El extracto obtenido, se concentra, se reconstituye con 2 mL de acetonitrilo y se analiza por HPLC-FLU con el método cromatográfico propuesto.

Este extracto, se cuantifica con el factor de respuesta de los HAPs de un patrón preparado en un vial de inyector automático mezclando 500 µL del mismo patrón adicionado sobre la muestra con 1,5 mL de acetonitrilo. Este patrón se inyecta como una muestra, juntamente con el extracto del blanco adicionado.

Se debe de comprobar que la eficiencia de la recuperación para todos los HAPs a estudio debe estar comprendida entre el 80 y el 120%. Esta se calcula como la relación entre los factores de respuesta obtenida para cada uno de los HAPs en el extracto y en el patrón de adición, expresada en porcentaje.

En aquellas ocasiones en las que no es posible disponer de suficientes filtros de cuarzo blanco, se estudia la eficiencia de desorción adicionando el patrón directamente sobre la tierra de diatomeas en el interior de la celda.

Cabe destacar que, en todos los ensayos realizados, se ha conseguido cumplir los valores de eficiencia de desorción.

Si en alguna ocasión no se cumple con el valor de la eficiencia de la desorción, se debería repetir el proceso, por si ha sido un problema puntual en la extracción. Pero si se vuelven a obtener resultados no satisfactorios, se debe pensar en que existen problemas con el sistema ASE.

- **Control de la etapa de cuantificación o cromatográfica: blancos, calibración y ensayo de idoneidad.**

La secuencia cromatográfica propuesta para el análisis de las muestras se presenta en la [Tabla 110].

Tabla 110. Secuencia de análisis propuestas para la determinación de HAPs en muestras de aire ambiente.

| Orden inyección | Disoluciones | Número de inyecciones | Ensayo |
|-----------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------|
| 1 | Blanco ACN | 1 | Ensayo idoneidad |
| 2 | Patrones de calibración: 10, 40, 80, 200, 400 y 1000 ng/mL | 2 [1 inyección/método] | |
| 3 | Blanco ACN | 1 | Calibración (1) |
| 4 | Muestra 1 | 2 [1 inyección/método] | Muestras |
| 5 | Blanco ACN | | |
| | | | |
| 6 | Muestra 8 | 2 [1 inyección/método] | Calibración (2) |
| 7 | Blanco ACN | | |
| 8 | Patrones de calibración: 10, 40, 80, 200, 400 y 1000 ng/mL | 2 [1 inyección/método] | |
| 9 | Blanco ACN | 1 | |

Como se puede observar en la secuencia de inyecciones propuestas, para controlar el sistema cromatográfico:

- Se inyectan blancos de disolvente, tanto antes y después de la serie de patrones, como entre muestras. De esta manera, se asegura la limpieza del sistema y se evitan contaminaciones cruzadas. Como hay tantas inyecciones de blancos, se propone inyectarlos de diferentes viales.
- Los patrones de calibración incluyen 6 disoluciones que cubren un margen de concentraciones entre 10 ng/mL y 1000 ng/mL (equivalentes a una concentración en el filtro de 20 a 2000 ng/filtro). Si se considera que el volumen de aire muestreado es de 1000 m³, el rango de trabajo que cubren las disoluciones de calibración son de 0,02 ng/m³ a 2 ng/m³. El rango superior corresponde al doble de la concentración legislada para el BaP.

Estos patrones se inyectan en orden creciente de concentraciones, antes y después de las muestras.

Para la cuantificación, se calculan los factores de respuesta promedios para cada analito, en todo el rango de concentraciones propuesto, de los patrones inyectados antes y después de las muestras.

- Antes de la inyección de las muestras, se debe cumplir el ensayo de idoneidad. Éste consiste en un conjunto de actividades que permiten comprobar que el método de análisis y el sistema (analista, reactivos o instrumental) es adecuado para el uso que ha establecido y validado. El ensayo de idoneidad incluye parámetros de evaluación relacionados tanto con la selectividad, como con la separación cromatográfica, como con el método de cuantificación y detección. Además, incluye los criterios de aceptación, que deben cumplirse para poder asegurar el correcto funcionamiento del sistema y poder asegurar que las muestras se analizan en condiciones equivalentes a cuando se llevó a cabo la validación.

En la [Tabla 111], se incluyen los parámetros que constituyen, en este caso, el ensayo de idoneidad del sistema.

Tabla 111. Parámetros de evaluación en el ensayo de idoneidad del procedimiento para la determinación de los HAPs en muestras de aire ambiente.

| Categoría | Parámetros de evaluación | Criterio de aceptación |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Selectividad | Blanco de disolvente | HAPs < 3 ng/mL |
| Separación cromatográfica | Resolución entre los picos de B _j F y B _b F en el patrón de 80 ng/mL a 285/500 | > 1,2 |
| | <i>Precisión:</i> CV% áreas de los HAPs a 296/405 | ≤ 3% |
| | <i>Recta de calibrado:</i> CV% factores de respuesta para todos los HAPs a las parejas de longitudes de onda propuestas | ≤ 8% |
| Cuantificación | <i>Estabilidad de los patrones:</i> En el patrón de 80 ng/mL a las longitudes de onda 318/510 (B _j F e IP) y 296/405 (resto HAPs), calcular la relación de los factores de respuesta da cada uno de los HAPs respecto la BaP (FRr). Estos FRr de la serie, se comparan con los de los patrones recién preparados | ± 10% |
| | <i>Límite de detección:</i> En el patrón de 10 ng/mL, relación señal/ruido B _j F (318/510) y B _b F (296/405) | > 10 |
| Detección | <i>Estabilidad de la respuesta:</i> Deriva de la respuesta entre calibraciones (entre muestras) | ≤ 5% |

La representación de los resultados de los diferentes parámetros evaluados en los ensayos de idoneidad, a lo largo del tiempo, han permitido obtener las cartas o los gráficos de control.

En la [Figura 77] se presenta, en forma de ejemplo, el gráfico de control correspondiente al coeficiente de variación de los factores de respuesta como parámetro representativo de la recta de calibrado. Se incluyen los resultados correspondientes a todos los analitos de estudio de 47 series de análisis. Se marca el valor límite ($CV\%_{FR} < 8\%$) y el 20% del valor límite, además del valor promedio de los resultados obtenidos (tratados todos de forma conjunta independiente del analito) y el valor promedio más tres veces la desviación estándar de los resultados.

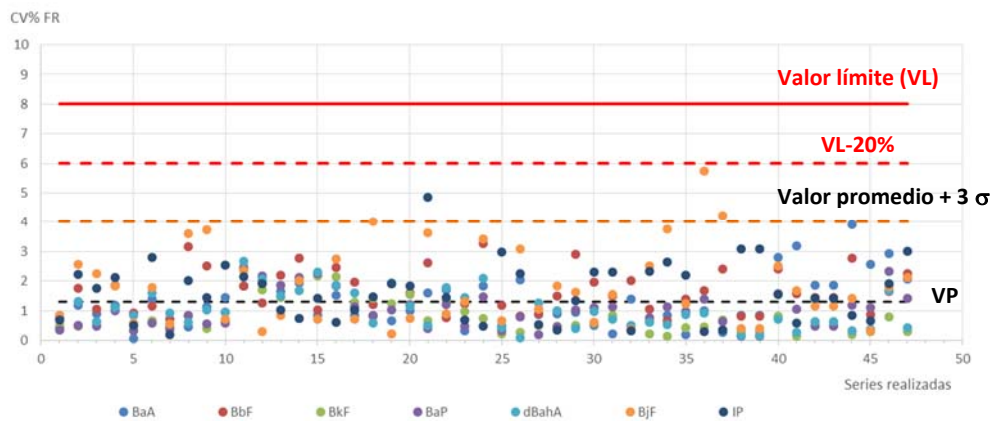


Figura 77. Gráfico de control del procedimiento para la determinación de HAPs en muestras de aire ambiente. Representación de los coeficientes de variación de los factores de respuesta para cada uno de los HAPs a las parejas de longitudes de onda principales: 296/405 (BaA, BbF, BkF, BaP, DiBahA) y 318/510 (BbF e IP). Se marca el valor límite especificado en el procedimiento ($CV\% (FR) < 8\%$) y el 20% del valor límite. Además, se marca el valor promedio (VP) y el valor promedio más tres veces la desviación estándar.

Como se puede observar no hay ningún valor que sobrepase el 20% del valor límite, por lo que todos los resultados se encuentran en la zona de aceptación, descartando resultados cuestionables. Además, el 99% de los valores obtenidos se encuentran en la zona inferior al valor promedio más tres veces la desviación estándar, indicando que se tiene una distribución normal, y no se observa ninguna tendencia en los resultados obtenidos.

Sin embargo, se observa que el valor límite especificado en el procedimiento es el doble del valor promedio más tres veces la desviación estándar.

• Control de interferencias de matriz

Para controlar las interferencias de matriz, se tiene en cuenta la relación entre las respuestas obtenidas a las diferentes longitudes de onda ensayadas, para cada uno de los analitos de estudio. Se comparan las relaciones de respuestas obtenidas con los patrones de calibración y con las muestras. Si la variación entre ambas es superior al 10%, se puede decir que existe una interferencia a una de las parejas de longitudes de onda de trabajo. Así, se calcula la concentración de cada analito a todas las parejas longitudes de onda con el factor de respuesta correspondiente en cada caso y se desestiman los resultados de las parejas de longitudes de onda que tienen interferencia. Los otros valores se promedian para obtener el resultado del compuesto correspondiente.

En la [Tabla 112], se presenta la relación de respuestas entre las parejas de longitudes de onda de cada analito a estudio. Corresponden a valores promedio obtenidos con patrones. Cabe destacar que, los valores a comparar con las muestras, se recalcularán en cada una de las series de análisis con los patrones de calibración correspondientes.

Tabla 112. Relación de respuestas entre parejas de longitudes de onda para cada uno de los 7 HAPs a estudio en muestras de aire ambiente. Se incluye la relación de pareja de longitudes de onda secundaria vs primarias y la relación entre secundarias, para el BbF, BjF e IP.

| Relación pareja de longitudes de onda secundaria vs. primaria | | | | | | | |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Compuesto | Relación áreas | | | | | | |
| | 290/430 vs 296/405 | 285/400 vs 296/405 | 293/485 vs 296/405 | 295/500 vs 296/405 | 295/500 vs 318/510 | 293/485 vs 318/510 | 380/500 vs 318/510 |
| BaA | 0,95 | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| BbF | 22,3 | -- | 1,6 | 1,1 | -- | -- | -- |
| BkF | 0,91 | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| BaP | 0,86 | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| DiBahA | -- | 1,1 | -- | -- | -- | -- | -- |
| BjF | -- | -- | -- | -- | 0,55 | -- | 0,55 |
| IP | -- | -- | -- | -- | 1,7 | 1,5 | 1,8 |

| Relación pareja de longitudes de onda secundaria vs. secundaria | | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| Compuesto | Relación áreas | | |
| | 380/500 vs 295/500 | 295/500vs 293/485 | 293/485 vs 290/430 |
| BbF | -- | 0,68 | 0,70 |
| BjF | 0,90 | -- | -- |
| IP | 1,05 | 1,17 | -- |

Con la finalidad de presentar las parejas de longitudes de onda, que suelen dar problemas a la hora de realizar la cuantificación en las muestras de aire ambiente analizadas en este trabajo, se presentan gráficamente las relaciones de áreas entre muestras y patrones a las parejas de longitudes de onda de estudio para cada uno de los analitos, de un total de 41 muestras. Éstas representan un mes de las muestras de la XVPCA analizadas en la Sección de Cromatografía del IQS, en los concursos públicos adjudicados. Se incluyen muestras captadas en 11 estaciones: Berga (5), Constantí (5), Igualada (5), La Bisbal (5), Lleida (5), Manlleu (5), Montcada i Reixac (4), Sant Celoni (1), Tiana (2), Tortosa (2) y Vilanova y la Geltrú (2)

En la [Figura 78], la [Figura 79] y la [Figura 100] se presentan los resultados correspondientes a la relación entre las respuestas a 290/430 (pareja de longitudes de onda secundaria) y 296/405 (pareja de longitudes de onda principal), entre muestra y patrón, para BaA, BkF y BaP de las 41 muestras.

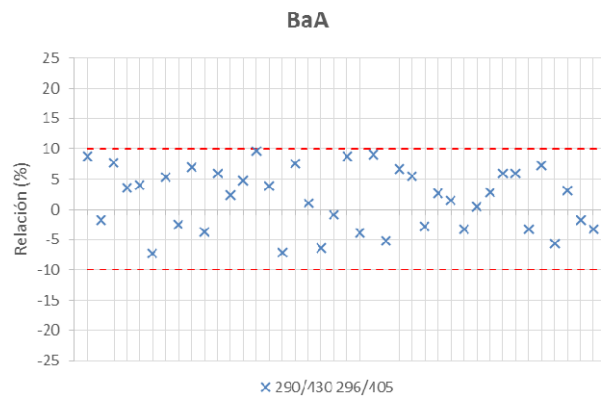


Figura 78. Relación entre las respuestas a 290/430 y 296/405 de muestra y patrón para el BaA, correspondientes a 41 muestras de aire ambiente. Con la línea roja se marca el criterio de aceptación.

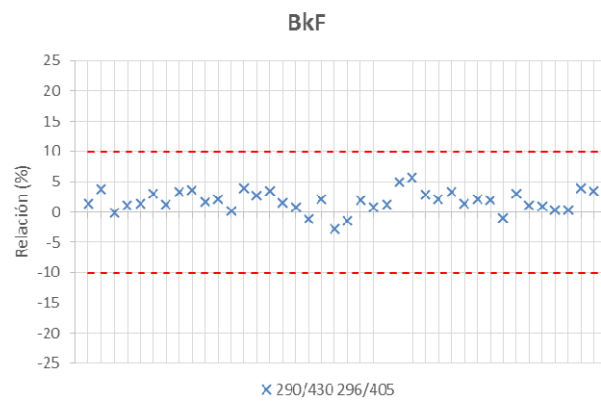


Figura 79. Relación entre las respuestas a 290/430 y 296/405 de muestra y patrón para el BkF, correspondientes a 41 muestras de aire ambiente. Con la línea roja se marca el criterio de aceptación.

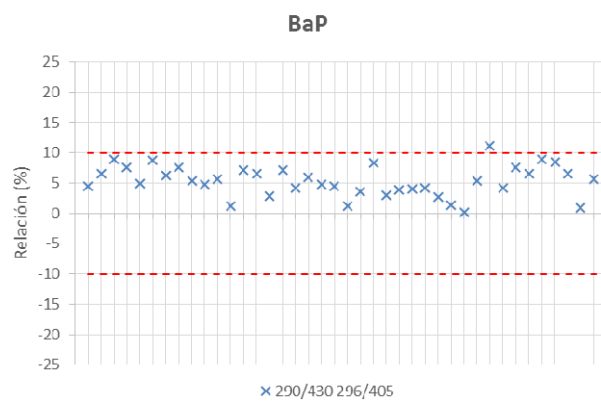


Figura 80. Relación entre las respuestas a 290/430 y 296/405 de muestra y patrón para el BaP, correspondientes a 41 muestras de aire ambiente. Con la línea roja se marca el criterio de aceptación.

En la [Figura 81], se presentan los resultados correspondientes a la relación entre las respuestas a 285/400 (pareja de longitudes de onda secundaria) y 296/405 (pareja de longitudes de onda principal), entre muestra y patrón, para DiBahA.

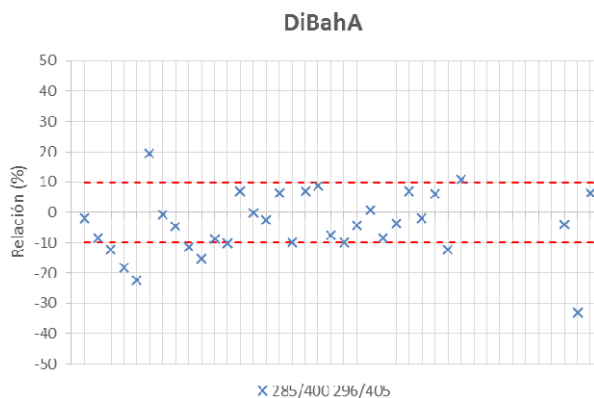


Figura 81. Relación entre las respuestas a 285/400 y 296/405 de muestra y patrón para el DiBahA, correspondientes a 41 muestras de aire ambiente. Con la línea roja se marca el criterio de aceptación.

Como se puede observar, en los resultados obtenidos para el BaA, BbF y BaP no suelen haber problemas de interferencias en las muestras a ninguna de las dos parejas de longitudes de onda seleccionadas. Sin embargo, en el caso del BaP, se observa que los resultados no se distribuyen de forma aleatoria, sino que todos los valores se encuentran en la zona positiva. Esto puede indicar que la señal a 290/430 en la muestra tiene un área superior en la muestra que en el patrón indicando una interferencia. Aunque ésta no suele ser suficientemente significativa porque en la mayoría de los casos la relación es inferior al 10%.

En el caso del DiBahA, se observa que un 20% de los resultados obtenidos no cumplen con el criterio de aceptación. Esto es debido, fundamentalmente, no tanto a la presencia de interferencias sino que este compuesto suele ser el que se encuentra en menor concentración en las muestras y tiene un mayor error de integración asociado ya que se encuentra más influenciado por el nivel de fondo, que se refleja en una variación mayor. Sin embargo, es importante destacar que, especialmente a la pareja de longitudes de onda principal (296/405) donde la señal es menor, se observa un pico justo delante del de DiBahA que puede provocar que la relación no se cumpla.

En la [Figura 82], se presentan los resultados correspondientes a la relación entre las respuestas a las parejas de longitudes de onda secundarias (290/430, 293/485 y 295/500) y la pareja de longitudes de onda principal (296/405), entre muestra y patrón, para BbF. Además, también se incluyen la relación entre parejas de longitudes de onda secundarias (290/430 vs 293/485 y 293/485 vs. 295/500).

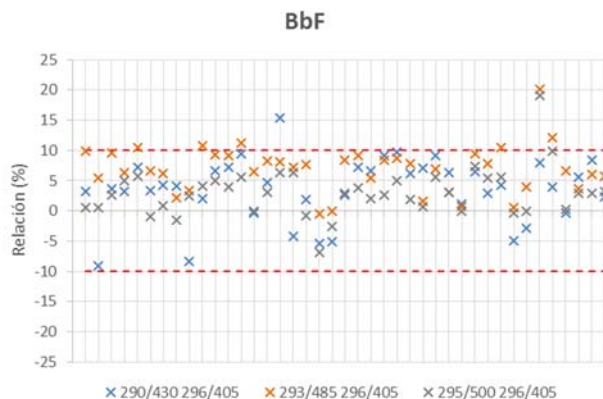
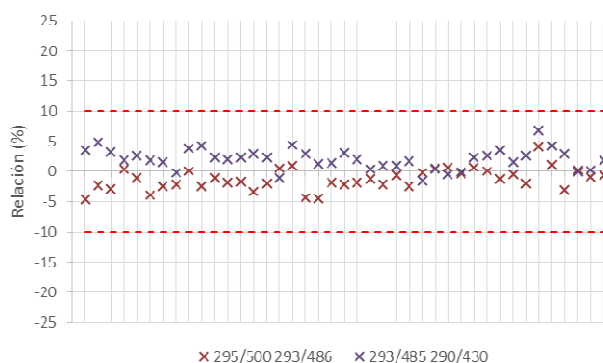
Pareja longitudes de onda secundarias vs. Principal**Pareja longitudes de onda secundarias vs. Secundaria**

Figura 82. Relación entre las respuestas de parejas de longitudes de onda secundarias (290/430, 293/485 y 295/500) respecto a la principal (296/405) de muestra y patrón para el BbF correspondientes a 41 muestras de aire ambiente [superior]; relación entre parejas de longitudes de ondas secundarias [inferior]. Con la línea roja se marca el criterio de aceptación.

Para el BbF se dispone de una pareja de longitudes de onda principal (296/405) que es la que presenta menos señal. Por eso, si se estudian los resultados obtenidos en las 41 muestras se observa que cuando se consideran las longitudes de onda secundarias no aparecen problemas. Sólo se observa algún problema en alguna de las muestras cuando se relaciona la señal a 290/430 respecto a 296/405, obteniéndose resultados mayores que en el patrón. Esto puede ser debido bien a que la integración a 296/405 se ha realizado por defecto o porque a 290/430 se tiene una interferencia.

En la [Figura 83] y en la [Figura 84], se presentan los resultados correspondientes a la relación entre las respuestas a las parejas de longitudes de onda secundarias (380/500 y 295/500) y la pareja de longitudes de onda principal (318/510), entre muestra y patrón, para B_JF e IP, respectivamente. También se incluyen la relación entre parejas de longitudes de onda secundarias (380/500 vs. 295/500). En estos casos, la escala se ha tenido que ampliar para poder presentar todos los resultados obtenidos.

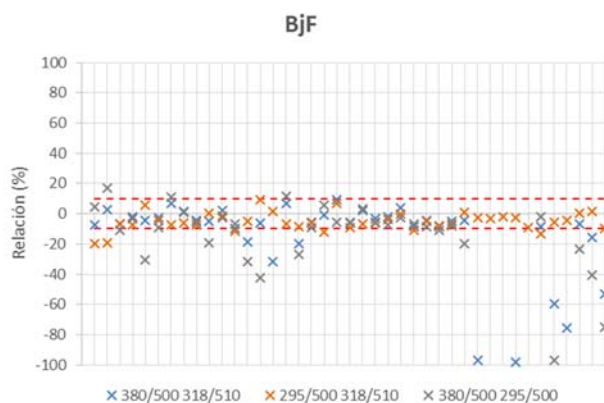


Figura 83. Relación entre las respuestas de parejas de longitudes de onda secundarias (380/500 y 295/500) respecto a la principal (318/510) y entre parejas de longitudes de onda secundarias, de muestra y patrón para el BfF correspondientes a 41 muestras de aire ambiente. Con la línea roja se marca el criterio de aceptación.

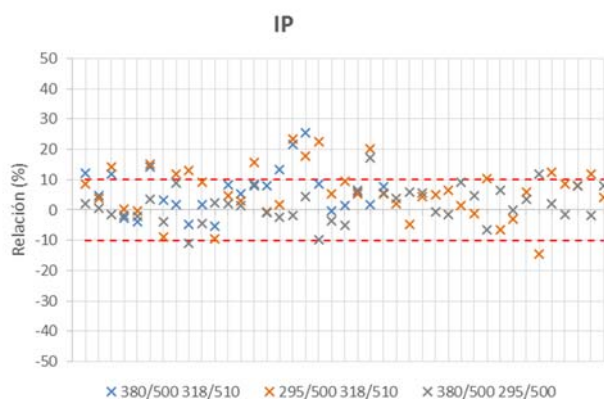


Figura 84. Relación entre las respuestas de parejas de longitudes de onda secundarias (380/500 y 295/500) respecto a la principal (318/510) y entre parejas de longitudes de onda secundarias, de muestra y patrón para el IP correspondientes a 41 muestras de aire ambiente. Con la línea roja se marca el criterio de aceptación.

Como se puede observar, los picos que suelen presentar más interferencias corresponden al BfF y al IP. Es importante destacar, que estos compuestos son los que presentan menos señal a todas sus longitudes de onda ensayadas (son menos fluorescentes). En el caso del BfF, se observa que hay un conjunto de muestras en las que las relaciones donde aparece la pareja de longitudes de onda 380/500 dan resultados siempre por defecto. Esto indica que aunque sea la pareja de longitudes de onda aparentemente más selectiva, presenta una interferencia. Así, en estos casos, la concentración a esta pareja de longitudes de onda quedaría descartada.

Para el IP, se observa una distribución más aleatoria de los resultados, pero también se observa una mayor proporción de resultados que pueden presentar interferencias. En este caso, parece estar más relacionados con la pareja 318/510 (pareja de longitudes de onda principal), que es donde la señal es menor. Sin embargo, se debería valorar cada caso de forma individual.

5. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS HAPs EN MUESTRAS DE AIRE AMBIENTE. COMPARACIÓN CON LA NORMA UNE-EN 15549:2008.

5.1. PROCEDIMIENTO INTERNO: IQS-CROMA PNT-A-0079.

El procedimiento para la determinación de HAPs (BaA, BbF, BkF, BjF, BaP, DiBahA e IP) en muestras de aire ambiente se describe detalladamente en el procedimiento normalizado de trabajo de la Sección de Cromatografía del IQS:

IQS-CROMA PNT-A-0079 *“Determinació d’hidrocarburs aromàtics policíclics en fase particulada (PM10) per cromatografia líquida amb detecció de fluorescència (HPLC-FLU)”*

El procedimiento descrito se basa en la extracción de los HAPs que están adheridos en la fracción particulada PM10 y posterior análisis por cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia.

Los rangos de trabajo que cubre el procedimiento son los siguientes:

- 20 ng/filtro a $20 \cdot 10^3$ ng/filtro para BaA, BbF, BkF, BaP y DiBahA
- 30 ng/filtro a $20 \cdot 10^3$ ng/filtro para BjF e IP

Si se considera un volumen de aire muestreado de 1000 m^3 (volumen promedio de los filtros disponibles, redondos y cuadrados) el rango de trabajo expresado en ng/m^3 es el siguiente:

- $0,02 \text{ ng}/\text{m}^3$ a $20 \text{ ng}/\text{m}^3$ para BaA, BbF, BkF, BaP y DiBahA
- $0,03 \text{ ng}/\text{m}^3$ a $20 \text{ ng}/\text{m}^3$ para BjF e IP

Como se puede observar, el rango de trabajo incluye el valor objetivo incluido en el Real Decreto para el BaP ($1 \text{ ng}/\text{m}^3$).

Este procedimiento de análisis está acreditado por ENAC según la Norma ISO 17025: 2005, para la determinación de BaA, BbF, BkF, BjF, DiBahA e IP en muestras de aire ambiente. No se incluye el BaP, porque para este analito, la acreditación es según la Norma UNE-EN-15549:2008. Por lo que queda claro, que el procedimiento descrito cumple con las especificaciones de la norma de referencia, no sólo para el BaP sino para los 7 HAPs a estudio en muestras de aire ambiente.

Las condiciones de trabajo se presentan, a continuación, de forma resumida.

Además, en el siguiente apartado, se presentan los puntos especificados en la norma ya incluidos en el procedimiento IQS-CROMA PNT-A-0079, que han permitido la acreditación del BaP, según la norma de referencia.

Características generales

| | |
|---------------------|-------------------------------------------------------|
| Analitos | BaA, BbF, BkF, BjF, BaP, DiBahA e IP |
| Matriz | Muestras de aire ambiente (fracción particulada PM10) |
| Técnica de análisis | HPLC-FLU |

Conservación y preparación de las muestras

| | |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Conservación | Tanto los filtros blancos como los filtros muestreados se almacenan con el material particulado protegido, para evitar el contacto con la luz, dentro de la cámara de acondicionamiento a una temperatura de 20±1°C y una humedad relativa de 50±5% |
| Preparación | En el interior de una celda de ASE de 33 mL limpia y abierta sólo por la parte superior, se coloca el filtro de celulosa y una espátula de tierra de diatomeas (agente dispersante). El filtro entero se corta en el interior de la celda evitando pérdidas de material particulado, y se mezcla con tierra. Es importante la homogenización y compactación de esta mezcla para asegurar una buena extracción. La mezcla se prensa ligeramente, se acaba de llenar la celda con tierra y se cierra para proceder a la extracción |

Extracción, concentración y reconstitución

| | |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Extracción ASE | <i>Sistema ASE 350 (Dionex)</i> Condiciones del método de extracción: Temperatura: 120°C Heat: 6 min Static time: 8 min Cycles: 2 Rinse Volume: 70% Purge: 100s Solvent Saver: OFF Volumen aproximado del extracto obtenido= 45 mL |
| Concentración | <i>Sistema de concentración TurboVap®-II</i> El extracto obtenido se introduce completamente en un tubo de vidrio del TurboVap®, y se concentra a sequedad con nitrógeno fijando la temperatura del baño a unos 45°C. |
| Reconstitución | El extracto seco se reconstituye con 2 mL de acetonitrilo y se agita ligeramente en un baño de ultrasonidos. La disolución se pasa a través de un filtro de 0,45 µm antes de ser inyectada en el equipo de HPLC |

Análisis HPLC-FLU

| | |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Patrones de calibración Test de idoneidad</p> | <p>10, 40, 80, 200, 400 y 1000 ng/mL en acetonitrilo.</p> <p>Rango equivalente en muestra: 20 ng/filtro a 2000 ng/filtro</p> <p>Preparados por dilución a partir del patrón conjunto de HAPs PAH-MIX9 (Dr. Ehrenstorfer ref: XA20950009AL, concentración 100 mg/L) y el patrón concentrado de benzo(j)fluoranteno (Dr. Ehrenstorfer ref: C20575000)</p> |
| <p>Columna</p> | <p>Pursuit 3 PAH (10 cm x 4,6 mm, 3 µm) Pre-columna: Pursuit 3 PAH Metaguard 3,0 mm</p> |
| <p>Condiciones cromatográficas</p> | <p>Tª columna: 28 ± 1°C Volumen inyección: 20 µL Flujo: 1 mL/min Fase móvil: A: Agua MilliQ, B: ACN</p> <p>Patrones gradiente (Lineal): 0,0-1,5 min: 20% Fase A/80% Fase B 9,0-15,0 min: 100% Fase B 15,0-20,0 min: 20% Fase A/80% Fase B (estabilización)</p> <p>Muestras gradiente (Lineal): 0,0-1,5 min: 20% Fase A/80% Fase B 9,0-18,0 min: 100% Fase B 18,0-22,0 min: 20% Fase A/80% Fase B (estabilización)</p> |
| <p>Condiciones de detección (FLU)</p> | <p>Método 1: CANAL A: λ_{excitación}=285 nm / λ_{emisión}=400 nm [DiBahA] CANAL B: λ_{excitación}=293 nm / λ_{emisión}=485 nm [BbF e IP] CANAL C: λ_{excitación}=296 nm / λ_{emisión}=405 nm [BaA, BbF, BkF, BaP y DiBahA] CANAL D: λ_{excitación}=318 nm / λ_{emisión}=510 nm [BjF e IP]</p> <p>Método 2: CANAL A: λ_{excitación}=290 nm / λ_{emisión}=430 nm [BaA, BbF, BkF y BaP] CANAL B: λ_{excitación}=295 nm / λ_{emisión}=500 nm [BbF, BjF e IP] CANAL C: λ_{excitación}=296 nm / λ_{emisión}=405 nm [BaA, BbF, BkF, BaP y DiBahA] CANAL D: λ_{excitación}=380 nm / λ_{emisión}=500 nm [BjF e IP]</p> |
| <p>Ensayo de idoneidad</p> | <p><i>Detallado en el apartado:</i> Control de la etapa de cuantificación o cromatográfica: blancos, calibración y ensayo de idoneidad [Tabla 111]</p> |

Cuantificación

| | |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cuantificación | <p>La cuantificación se realiza por patrón externo, para cada una de las parejas de longitud de onda característica de cada analito. Se utilizan los factores de respuesta promedio de los seis niveles de concentración inyectados en la calibración.</p> <p>Se calcula para patrones y muestras, la relación de respuestas obtenidas a las diferentes parejas de longitudes de onda ensayadas y se comparan con la finalidad de detectar posibles interferencias de matriz.</p> <p>Así, los resultados para cada analito se obtienen de las longitudes de onda donde no se ha detectado interferencia.</p> <p>Los resultados se entregan con dos cifras significativas en ng/filtro.</p> <p>Los resultados en ng/m³ se calculan teniendo en cuenta el volumen de aire muestreado, pero este resultado, está fuera del alcance de acreditación.</p> |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Es importante destacar, que en el procedimiento se incluyen las actividades de control rutinario especificadas detalladamente en el apartado anterior.

5.2. PUNTOS ESPECIFICADOS EN LA NORMA UNE-EN 15549:2008 PARA LA DETERMINACIÓN DE BaP EN MUESTRAS DE AIRE AMBIENTE INCLUIDOS EN EL PROCEDIMIENTO IQS-CROMA PNT-A-0079.

La norma de referencia UNE-EN 15549:2008 presenta un método de medida para la determinación de benzo(a)pireno en muestras de aire ambiente. Incluye condiciones tanto de muestreo como de análisis. En este caso, la acreditación del procedimiento sólo se realizará de la parte de análisis, por lo que no se consideraran las condiciones de muestreo especificadas.

La norma de referencia incluye los siguientes puntos, de interés en el ámbito analítico, que se han tenido que considerar en el procedimiento de trabajo:

- **Rango de trabajo:**
Incluye como rango de trabajo de aproximadamente 0,04 ng/m³ a 20 ng/m³, es decir, el límite superior queda perfectamente fijado, y coincide con el procedimiento de trabajo, pero el límite inferior puede variar. La norma específica que el límite inferior vendrá definido por el tipo de detector que se utiliza y el nivel de blanco del laboratorio. En el caso del procedimiento IQS, se ha podido fijar el límite inferior en 0,02 ng/m³ para BaP, por lo que es del mismo orden del que se incluye en la norma.

- **Almacenamiento de los filtros:**

La norma propone que los filtros muestreados deben conservarse protegidos de la luz a una temperatura inferior a 20°C. En este caso, el procedimiento de trabajo no cumple con esta especificación ya que los filtros se conservan en la cámara de acondicionamiento exactamente a 20°C. En este caso, se proponen dos alternativas:

- Seguir almacenando los filtros en la cámara donde se les realiza el control del material particulado, ya que la temperatura y la humedad están perfectamente controladas. Esto se sigue cuando el análisis de HAPs se realiza directamente después del control de las partículas.
- Almacenar los filtros cerrados en un recipiente hermético dentro de una nevera (temperatura 2-8°C). Esto se sigue cuando a los filtros sólo se les realiza el análisis de HAPs, sin control previo del material particulado.

- **Método de análisis:**

Como método analítico, la norma propone una extracción del filtro con disolvente orgánico y posterior análisis por HPLC-FLU o GC-MS, de manera que las condiciones de trabajo quedan totalmente abiertas. A nivel de extracción y a título informativo permite el uso tanto de ultrasonidos, microondas, Soxhlet o ASE. En el caso de ASE, propone trabajar con diclorometano como disolvente a 120°C con ciclos de 5 min.

En lo que hace referencia a la purificación, especifica que sólo se debe realizar si se considera necesario.

La cuantificación la permite realizar tanto por patrón externo como por patrón interno.

A nivel de análisis, el punto que queda bien fijado son los patrones de calibración. Se indica que:

- Se deben incluir como mínimo 5 disoluciones de calibración. En el caso del procedimiento de trabajo se incluyen 6 disoluciones (de 10, 40, 80, 200, 400 y 1000 ng/mL).
- Deben estar preparadas con acetonitrilo como disolvente, tal y como se realiza en el procedimiento de trabajo.
- El patrón más bajo debe estar cercano al límite de detección, aunque ligeramente por encima, tal y como se realiza en el procedimiento de trabajo.
- Debe incluir el margen de $\pm 20\%$ del valor objetivo. En el procedimiento propuesto, el valor objetivo (1 ng/m³) equivale a una concentración en extracto inyectado de 500 ng/mL, por lo que, el rango de las disoluciones de calibración debe incluir las disoluciones de 400 ng/mL a 600 ng/mL. Por lo que se cumple, ya que la disolución patrón de calibración más concentrada es de 1000 ng/mL.
- Las disoluciones de calibración se deben inyectar antes de las muestras o se debe comprobar que no hay variación en la calibración (se acepta un 5%). En el caso del procedimiento de trabajo, las disoluciones de calibración se inyectan antes y después de series de 8 muestras.
- La cuantificación la propone por interpolación en la recta de calibrado. En el procedimiento de trabajo se propone utilizar los factores de respuesta promedio pero aceptando un coeficiente de variación de los mismos del 8%.

- **Controles de calidad:**

En la norma de referencia se incluyen una serie de controles de calidad que han sido incorporados en el procedimiento de trabajo como:

- *Blanco de material del laboratorio.* Indica que el material utilizado para la preparación de las muestras debe tener un contenido en BaP inferior a 0,04 ng/m³. En el procedimiento de trabajo, el nivel de exigencia es mucho mayor, ya que se especifica que la concentración de HAPs en los blancos, tanto de material como de reactivos, debe de ser tres veces inferior a la concentración más baja de los patrones de calibración. Así, si el patrón más diluido es de 10 ng/mL la concentración exigida en los blancos es de 3 ng/mL (equivale a una concentración de 6 ng/filtro o de 0,006 ng/m³), casi 7 veces inferior a la que exige la norma de referencia.
- *Blanco de reactivo.* La norma específica que se deben de hacer blancos de reactivo cada 15 muestras o cada vez que se inicia un nuevo lote de reactivo. En nivel de HAPs aceptado es equivalente al que se propone para el blanco de material. La periodicidad con la que se realizan los blancos de reactivo (acetona y acetonitrilo) en el procedimiento de trabajo es equivalente a la que se propone en la norma pero el nivel mínimo aceptado de HAPs es más exigente, tal y como se ha indicado con el blanco de material de laboratorio.
- *Estudio de la eficiencia de la recuperación.* La norma específica que se debe controlar de forma periódica la eficiencia de la recuperación, adicionando sobre un filtro blanco una determinada cantidad de patrón de BaP. Tras realizar el procedimiento completo, el valor de recuperación debe estar comprendido entre el 80-120%. En el procedimiento de trabajo también se incluye este control. Se propone realizar cada 20 muestras o si las series de muestras no se realizan muy seguidas, cada serie de análisis de nuevas muestras. Los criterios de aceptación establecidos equivalen a los de la norma de referencia.
- *Recta de calibrado.* La norma específica que los patrones de calibración deben tener una precisión inferior o igual al 3% y que la deriva de la respuesta no puede ser superior al 5%. Estos dos criterios de aceptación están incluidos dentro del ensayo de idoneidad del procedimiento de trabajo para todos los analitos, pero además, se incluyen otras exigencias no especificadas en la norma.
- *Interferencias.* La norma de referencias, incluye un apartado de interferencias cromatográficas. Cuando se trabaja con HPLC, como es el caso, simplemente propone que la identificación de los picos se realice por tiempos de retención y realizando adiciones. Si el tiempo de retención del pico de adición varía en más de un 0,5% respecto al pico en el extracto sin adicionar, se puede decir que hay una interferencia. También propone, que si la concentración de analito es suficiente, se puede analizar el extracto por HPLC con detector de DAD y realizar su espectro de ultravioleta para comprobar si existe interferencias. En el procedimiento de trabajo, se ha considerado insuficiente la identificación de los

picos sólo por tiempos de retención. Por esta razón, se ha considerado necesario incluir el estudio de varias parejas de longitudes de onda de trabajo, haciendo la similitud con lo que se realizaría en una detección con espectrómetro de masas en modo SIM.

Tal y como se ha visto, el PNT desarrollado ya incluía los requerimientos de la norma, por lo que la acreditación de la determinación de benzo(a)pireno en muestras de aire ambiente ha podido llevarse a cabo según norma UNE-EN 15549:2008, aplicando en el laboratorio la misma sistemática que para el resto de HAPs, que se acreditan por procedimiento interno.

6. ACTIVIDADES RELACIONADAS CON LA GARANTIA DE CALIDAD DE LOS RESULTADOS.

Realmente para poder acreditar el procedimiento de trabajo según la norma ISO 17025:2005, es insuficiente con los puntos de control rutinario. Se exige que el procedimiento esté validado, que tenga la incertidumbre calculada y que el laboratorio incluya actividades de control continuo que permitan realizar el seguimiento de la validez de los ensayos. Entre estas actividades, se incluye el análisis regular de materiales de referencia y la participación en ejercicios de interlaboratorio (ejercicios de intercomparación o programas de ensayos de aptitud).

En lo que hace referencia a la incertidumbre, se debe recalcularse periódicamente, para garantizar la calidad del resultado que se envía al cliente.

A continuación, se presenta la validación del procedimiento de análisis, incluyendo el cálculo de la incertidumbre. Además, también se incluyen las actividades de control interno relacionadas con el análisis de muestras de referencia y con la participación en ejercicios de intercomparación.

6.1. VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

El procedimiento descrito para la determinación de los HAPs en muestras de aire ambiente ha sido convenientemente validado. Para ello, se han tenido en cuenta los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, límites de detección y cuantificación, repetibilidad de inyección, precisión (repetibilidad) y exactitud. Además, aprovechando los resultados de validación, se ha calculado la incertidumbre del procedimiento.

Antes de realizar la validación, se escribe el protocolo, donde se incluyen los criterios de aceptación, las disoluciones y los parámetros a realizar. A continuación, se presenta de forma resumida, tanto los criterios de aceptación como las disoluciones utilizadas durante la validación. Además, se presentan los resultados obtenidos, incluyendo la incertidumbre.

6.1.1. Definición de los criterios de aceptación.

En la [Tabla 113], se presentan los criterios de aceptación establecidos para los diferentes parámetros de calidad incluidos en la validación del procedimiento.

Tabla 113. Criterios de aceptación establecidos para el procedimiento de determinación de HAPs en muestras de aire ambiente (previos a la validación)

| Parámetro | Criterio de aceptación |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | Sin interferencias ni en material, ni en los disolventes, ni en el filtro |
| Selectividad | <i>Nota: se considerará que no hay interferencias de matriz si se cumple el criterio de aceptación de exactitud.</i> |
| | Para los 7 HAPs a estudio, en el rango de concentraciones especificado en el procedimiento: |
| Linealidad | <ul style="list-style-type: none"> - En el ajuste por mínimos cuadrados: $R^2 \geq 0,99$. - El coeficiente de variación (CV%) de los factores de respuesta ha de ser inferior o iguales al 8%. |
| Repetibilidad inyección | El coeficiente de variación de las áreas obtenidas de 3 repeticiones de inyección consecutivas de todos los patrones de calibración debe de ser inferior o igual al 3%. ($CV_{\text{área}} \% (n=3) \leq 3\%$) |
| LOD y LOQ | El LOD para cualquiera de los HAPs debe de ser inferior o igual a 6 ng/filtro para BaA, BbF, BkF, BaP y DiBahA y 10 ng/filtro para BjF e IP. El LOQ para cualquiera de los HAPs debe de ser inferior o igual 20 ng/filtro para BaA, BbF, BkF, BaP y DiBahA y 30 ng/filtro para BjF e IP. |
| Precisión | En 6 repeticiones de la muestra sin adicionar (nivel bajo) <ul style="list-style-type: none"> - $CV\%_{\text{precisión}}$ para BaP: $\leq 5\%$ - $CV\%_{\text{precisión}}$ para el resto de los HAPs: $\leq 10\%$ |
| Exactitud | La recuperación promedio para cada uno de los HAPs: 70-130% |
| Rango de trabajo | 20 ng/filtro a 20000 ng/filtro BaA, BbF, BkF, BaP y DiBahA 30 ng/filtro a 20000 ng/filtro BjF e IP |
| Incertidumbre | $U_{\text{expandida}} < 30\%$, para el BaP $U_{\text{expandida}} < 40\%$, para el resto de HAPs |

6.1.2. Descripción de las disoluciones que se utilizan en la validación.

A continuación se describen las disoluciones que se han preparado para realizar la validación del procedimiento para la determinación de HAPs en muestras de aire ambiente.

Disoluciones de patrones

Las disoluciones patrón que se utilizan en la validación, coinciden con las disoluciones de calibración del procedimiento. Así, se incluyen patrones de 10, 40, 80, 200, 400 y 1000 ng/mL de los HAPs a estudio.

Para ello se dispone del patrón conjunto concentrado PAH-MIX9 de 100 mg/L en acetonitrilo del laboratorio *Dr. Ehrenstorfer* (referencia: XA20950009AL), que incluye los 16 HAPs de la EPA, entre los que se encuentran 6 de los HAPs a estudio (BaA, BbF, BkF, BaP, DiBahA e IP). Como este patrón no incluye el benzo(j)fluoranteno, se cuenta con un patrón sólido de este compuesto, también del laboratorio *Dr. Ehrenstorfer* (referencia: C20575000). A partir del patrón sólido, se prepara una disolución de 100 mg/L, tomando 5,00 mg de patrón en un matraz de 50,0 mL y enrasándolo con acetonitrilo.

A partir de estas dos disoluciones concentradas, se prepara por dilución una disolución madre conjunta con todos los HAPs a estudio de 1000 ng/mL. Para ello, se toman 500 µL de cada una de las disoluciones concentradas y se introducen en un matraz aforado de 50,0 mL, con unos 25 mL ACN. Esta disolución se mezcla y se enrasa a volumen con el mismo disolvente. Esta disolución conjunta de 1000 ng/mL coincide con la disolución de calibración más concentrada. A partir de ésta, se preparan las otras disoluciones de calibración, controlando el volumen adicionado por pesada.

Patrón 400 ng/mL: 10,0 mL del patrón conjunto de 1000 ng/mL en aforado de 25,0 mL con acetonitrilo.

Patrón 200 ng/mL: 5,0 mL del patrón conjunto de 1000 ng/mL en aforado de 25,0 mL con acetonitrilo.

Patrón 80 ng/mL: 2,0 mL del patrón conjunto de 1000 ng/mL en aforado de 25,0 mL con acetonitrilo.

Patrón 40 ng/mL: 1,0 mL del patrón conjunto de 1000 ng/mL en aforado de 25,0 mL con acetonitrilo.

Patrón 10 ng/mL: 250 µL del patrón conjunto de 1000 ng/mL en aforado de 25,0 mL con acetonitrilo.

Estas disoluciones se utilizarán para valorar la linealidad de la respuesta de los HAPs a estudio, los límites de detección y cuantificación, la repetibilidad de inyección y se utilizarán como patrones de control para determinar la concentración de las muestras adicionadas.

Disoluciones de las muestras y las muestras adicionadas

Para realizar la validación, se utiliza la muestra que se ha utilizado para valorar la precisión y exactitud con Soxhlet y para poner a punto el sistema ASE. Como se ha comentado, está formada por restos de muestras reales de filtros de fibra de cuarzo procedentes de la fracción PM10 del material particulado de distintas estaciones de captación de Barcelona, que han sido triturados y homogeneizados convenientemente.

El nivel de HAPs en esta muestra es del orden de 30 a 300 ng/g (según compuesto), por lo que las adiciones se deberán realizar como mínimo a una concentración 3 veces superior a la ya presente en la muestra.

Si se considera que los filtros redondos cargados con partículas pesan del orden de 1,5 g, el nivel de HAPs en la muestra de referencia oscila, aproximadamente, entre 45 ng/filtro y 450 ng/filtro.

Para la preparación de la muestra, como en este caso no se puede trabajar con el filtro entero porque es una mezcla, se propone trabajar con 100 mg de la muestra y realizar el procedimiento normalmente. Para la preparación de las muestras adicionadas, se tomará la cantidad fijada de muestra y sobre ella se adicionará una determinada cantidad de patrón para llegar a tener el nivel de HAPs deseado en cada caso. Es importante destacar, que las adiciones deben cubrir todo el rango de trabajo que incluye el procedimiento, es decir, de 20 ng/filtro a 20000 ng/filtro

Para el estudio de selectividad se preparan las siguientes muestras:

- *Blanco de disolvente* (acetonitrilo).
- *Blanco de reactivo de extracción* (acetona)
- *Blanco de filtro*. Se prepara como una muestra pero se toma un filtro blanco.
- *Muestra*, para su preparación se toman 100 mg de muestra y se introduce en la celda de ASE

Para valorar la precisión del procedimiento, se preparan seis muestras (sin adicionar) de forma independiente, por lo que sólo se valorará a nivel bajo (nivel en el que normalmente se encuentran los HAPs en las muestras reales de aire ambiente).

Sin embargo, para valorar la exactitud se trabajará con muestras adicionadas. Se realizan adiciones a dos niveles de concentración (nivel medio y nivel alto). Como la muestra disponible ya tiene un nivel de HAPs bajo, no se realizan adiciones a este nivel de concentración. Todas las muestras se preparan por triplicado.

- *Muestra adicionada a nivel medio* (equivalente a 1500 ng/g o 2250 ng/filtro). Se toman los 100 mg de muestra y se adicionan 150 µL de la disolución de calibración conjunta de HAPs de 1000 ng/mL. En este caso, la concentración del extracto obtenido después

de la aplicación del procedimiento es de unos 75 ng/mL más la concentración procedente directamente de la muestra, que como máximo es de 15 ng/mL.

- *Muestra adicionada a nivel alto* (equivalente a 10000 ng/g o 15000 ng/filtro). Se toman los 100 mg de muestra y se adicionan 100 µL de la disolución conjunta de HAPs de 10000 ng/mL, preparada por dilución (1:10) del patrón conjunto PAH MIX9 de 100 mg/L y el patrón concentrado de B_JF de esta misma concentración. La concentración del extracto obtenido es de unos 500 ng/mL, por lo que se puede inyectar directamente sin dilución previa, ya que la concentración máxima de calibración es de 1000 ng/mL.

La recuperación a nivel bajo se calcula considerado como valor real el valor de consenso que se tiene para la muestra del ensayo del ejercicio de interlaboratorio. Éste se compara con la concentración que se obtiene para cada uno de los HAPs en el estudio de precisión del procedimiento.

6.1.3. Resultados del estudio de validación del procedimiento para la determinación de HAPs en muestras de aire ambiente.

A continuación se presentan los resultados obtenidos del estudio de validación del procedimiento para la determinación de HAPs (BaA, BbF, BkF, B_JF, BaP, DiBaH_A e IP) en filtros de partículas PM₁₀ por HPLC-FLU.

Cabe destacar, que teniendo en cuenta el interés y la importancia en la estimación de la incertidumbre de la medida propuesta en la Norma ISO 17025:2005, donde se indica que el laboratorio debe de tener y aplicar procedimientos para estimar la incertidumbre de la medición. En la presente tesis, se propone aprovechar los resultados de validación para el cálculo de la incertidumbre del procedimiento. (Gotor, Blanco, & Broto-Puig, 2008)

- **Selectividad**

Del análisis tanto de los blancos de reactivos (acetona y acetonitrilo), como del filtro blanco, como de la muestra, se puede decir que el procedimiento se selectivo ya que:

- El material utilizado, el blanco de disolvente (acetonitrilo) y el blanco de disolvente de extracción tratado como una muestra, concentrado y reconstituido, no presentan interferencias.
- El blanco de filtro tiene una concentración de HAPs inferior a 6 ng/filtro (3 ng/mL en el extracto obtenido).
- La resolución entre los siete picos de interés es superior a 1,2, tal y como se especifica en la norma de referencia para el BaP.

En este caso, se debe tener en cuenta que el estudio de selectividad se realiza para una determinada muestra y de una forma genérica en lo que hace referencia a blancos de proceso. Sin embargo, el procedimiento cuenta para cada inyección de muestra, con un estudio de posibles interferencias, ya que los picos no se identifican únicamente por tiempo de retención sino que se consideran como mínimo dos parejas de longitudes de onda de detección.

• **Linealidad**

Se estudia si la respuesta es lineal en el margen de concentraciones entre 10 y 1000 ng/mL de los siete HAPs a estudio (concentración equivalente en muestra entre 20 y 2000 ng/filtro de HAPs en el filtro).

Se propone estudiar la linealidad tanto a partir del ajuste por mínimos cuadrados como con el estudio de los factores de respuesta, siguiendo el mismo procedimiento que se ha realizado en el Capítulo I de la presente tesis para determinar la linealidad.

En la [Tabla 114] y en la [Tabla 115], se presentan los resultados obtenidos del ajuste por mínimos cuadrados y de los factores de respuesta, respectivamente.

Tabla 114. Resultados del ajuste por mínimos cuadrados para los HAPs en un rango de concentraciones de 10 a 1000 ng/mL, margen de calibración del procedimiento para la determinación de HAPs en muestras de aire ambiente. Se incluyen el rango de estudio, así como los coeficientes de determinación (R²) y los intervalos de confianza (IC) de los parámetros de la recta, pendiente y ordenada en el origen.

| Compuesto | Recta regresión | | Crítica modelo | Valoración parámetros recta | | | |
|----------------------|------------------------|-----------------|----------------|-----------------------------|--------------------|-----------------|---|
| | Pendiente (área/ng/mL) | Ordenada (área) | R ² | IC pendiente | IC ordenada origen | | |
| Benzo(a)antraceno | 2799 | -628,3 | 0,999992 | [2790, 2808] | √ | [-4644, 3388] | √ |
| Benzo(j)fluoranteno | 735 | 2211 | 0,9990 | [707,764] | √ | [-9024, 13446] | √ |
| Benzo(b)fluoranteno | 1615 | -176,8 | 0,999993 | [1614, 1609] | √ | [-2384, 2030] | √ |
| Benzo(k)fluoranteno | 19597 | -4038 | 0,999992 | [19533, 19660] | √ | [-32141, 24065] | √ |
| Benzo(a)pireno | 12194 | -6457 | 0,999990 | [12150, 12238] | √ | [-25910, 12997] | √ |
| Dibenzo(ah)antraceno | 929 | -9,5 | 0,999992 | [926, 932] | √ | [-1323, 1304] | √ |
| Indeno(123-cd)pireno | 899 | -729 | 0,999990 | [893, 900] | √ | [-2324, 865] | √ |

IC: intervalo de confianza calculado a partir del test de Student con un grado de confianza del 95%.

Tabla 115. Resultados de los factores de respuesta para los HAPs a estudio en el margen de calibración del procedimiento para la determinación de HAPs en muestras de aire ambiente.

| Compuesto | Rango: 10-1000 ng/mL FR (ng/mL/área) | |
|----------------------|-----------------------------------------|-------------|
| | Promedio | CV% |
| Benzo(a)antraceno | 3,60E-04 | 0,84 |
| Benzo(j)fluoranteno | 1,36E-03 | 3,3 |
| Benzo(b)fluoranteno | 6,26E-04 | 1,3 |
| Benzo(k)fluoranteno | 5,14E-05 | 0,79 |
| Benzo(a)pireno | 8,32E-05 | 1,4 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 1,09E-03 | 2,1 |
| Indeno(123-cd)pireno | 1,14E-03 | 1,8 |

Como se puede observar en los resultados obtenidos, en el ajuste por mínimos cuadrados para los HAPs a estudio, los coeficientes de determinación (R^2) son superiores al criterio de aceptación establecido ($R^2 \geq 0,99$), siendo el valor más ajustado el obtenido para el B_jF. Además, en todos los casos, se cumple la significación estadística tanto de la pendiente como de la ordenada en el origen.

En lo que hace referencia al estudio de la proporcionalidad de la respuesta con el coeficiente de variación de los factores de respuesta, se observa que en el rango de 10 a 1000 ng/mL, los coeficientes de variación obtenidos son claramente inferiores al 8%, establecido como criterio.

A partir de los resultados obtenidos se puede decir que el procedimiento es lineal en el rango de concentraciones estudiado (de 10 a 1000 ng/mL).

• Repetibilidad de inyección

Se estudia la repetibilidad de inyección de todos los patrones de calibración. Para ello, se inyectan por triplicado las series de patrones de 10 a 1000 ng/mL, de patrón más diluido a más concentrado, con una inyección de blanco entre series. De esta manera, no sólo se valora la repetibilidad de inyección sino también la estabilidad de la respuesta del detector a lo largo de las series de análisis.

En la [Tabla 116], se presentan los coeficientes de variación obtenidos para cada nivel de concentración y para cada uno de los 7 analitos a estudio.

Tabla 116. Resultados del estudio de la repetibilidad de inyección con los patrones de calibración del procedimiento de determinación de los HAPs en muestras de aire ambiente. Se incluyen los coeficientes de variación (CV%) de todos los niveles de calibración y para todos los analitos a estudio.

| Compuesto | CV % [n=3] | | | | | |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|---------------|
| | 10 ng/mL | 40 ng/mL | 80 ng/mL | 200 ng/mL | 400 ng/mL | 1000 ng/mL |
| Benzo(a)antraceno | 0,42 | 0,48 | 0,28 | 0,19 | 0,61 | 0,17 |
| Benzo(j)fluoranteno | 1,3 | 0,93 | 0,62 | 0,21 | 0,51 | 3,2 |
| Benzo(b)fluoranteno | 0,87 | 0,54 | 0,27 | 0,71 | 1,0 | 1,2 |
| Benzo(k)fluoranteno | 0,33 | 0,23 | 0,15 | 0,12 | 0,32 | 0,28 |
| Benzo(a)pireno | 0,37 | 0,38 | 0,12 | 0,21 | 1,3 | 0,37 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 0,98 | 0,49 | 0,44 | 1,4 | 0,69 | 1,2 |
| Indeno(123-cd)pireno | 1,5 | 0,75 | 0,28 | 0,29 | 0,38 | 0,59 |

Se puede decir que el procedimiento tiene una repetibilidad de inyección adecuada en todo el margen de concentraciones a estudio, ya que los coeficientes de variación obtenidos para todos los analitos son inferiores o iguales al 3%. Cabe destacar que todos los coeficientes de variación (CV%) están comprendidos entre 0,12% y 1,5%, a excepción de para el B_jF cuando el nivel de concentración es de 1000 ng/mL, que le corresponde un CV% de 3,2%. Este valor se atribuye a que el B_jF es el compuesto con menor señal fluorescente y que se eluye justo delante del B_bF. Se acepta el resultado ya que cumple el criterio, al no superar el “3%” establecido.

- **Límites de detección y cuantificación**

El límite de cuantificación para todos los analitos se establece como el nivel más bajo de la recta de calibrado que corresponde con:

10 ng/mL para BaA, BbF, BkF, BaP y DiBahA, que equivale a una concentración de 20 ng/filtro o 0,02 ng/m³ (si el volumen de aire muestreado es de 1000 m³).

15 ng/mL para B_jF e IP, que equivale a una concentración de 30 ng/filtro o 0,03 ng/m³ (si el volumen de aire muestreado es de 1000 m³).

EL límite de detección se ha calculado teóricamente como la concentración que proporciona una señal equivalente a tres veces el ruido en el tiempo de retención del pico ± 10 veces la anchura del pico a media altura, en el patrón de nivel de concentración más bajo. Los valores obtenidos son del orden de 1 ng/mL para BaA, BbF, BkF, BaP y DiBahA y de 5 ng/mL para B_jF e IP. Estas concentraciones equivalen, respectivamente con 2 ng/filtro (0,002 ng/m³) y 10 ng/filtro (0,01 ng/m³).

Por tanto, los resultados obtenidos cumplen los criterios establecidos, siendo el LOQ para cualquiera de los HAPs inferior o igual 20 ng/filtro para BaA, BbF, BkF, BaP y DiBahA y 30 ng/filtro para B_jF e IP. Por otra parte, el LOD para cualquiera de los HAPs es inferior o igual a 6 ng/filtro para BaA, BbF, BkF, BaP y DiBahA y 10 ng/filtro para B_jF e IP.

- **Precisión del procedimiento**

La precisión del procedimiento se determina analizando por sextuplicado la muestra de interlaboratorio. La concentración promedio para cada uno de los analitos, expresada en ng/g (ng/filtro y ng/m³), y los coeficientes de variación obtenidos, se presentan en la [Tabla 117]. La concentración en ng/filtro se ha calculado considerando que cada filtro redondo muestreado pesa aproximadamente unos 1,5 g. La concentración en ng/m³ se ha calculado considerando un volumen de aire muestreado promedio de 1000 m³.

Tabla 117. Resultados del estudio de precisión del procedimiento de determinación de los HAPs en muestras de aire ambiente. Se incluyen los coeficientes de variación (CV%) de cada uno de los analitos después de analizar la muestra por sextuplicado.

| Compuesto | Concentración promedio (n=6) | | | CV% [n=6] |
|----------------------|------------------------------|-----------|-------------------|--------------|
| | ng/g | ng/filtro | ng/m ³ | |
| Benzo(a)antraceno | 139 | 209 | 0,21 | 3,2% |
| Benzo(j)fluoranteno | 117 | 176 | 0,18 | 1,9% |
| Benzo(b)fluoranteno | 288 | 432 | 0,43 | 2,3% |
| Benzo(k)fluoranteno | 83 | 124 | 0,12 | 4,2% |
| Benzo(a)pireno | 131 | 196 | 0,20 | 2,2% |
| Dibenzo(ah)antraceno | 35 | 53 | 0,05 | 9,7% |
| Indeno(123-cd)pireno | 143 | 215 | 0,21 | 2,4% |

El procedimiento tiene una precisión adecuada ya que el coeficiente de variación que se obtiene al analizar una muestra es inferior al 5% para el BaP e inferior o igual al 10%, para el resto de HAPs.

- **Exactitud del procedimiento**

Para el estudio de exactitud, se estudia la recuperación a tres niveles de concentración (bajo: 40 ng/filtro; medio: 2000 ng/filtro; alto: 20000 ng/filtro).

A nivel bajo, se utiliza directamente la muestra disponible, procedente del estudio interlaboratorio, ya que tiene un nivel bajo de concentración. En este caso, la recuperación se ha calculado teniendo en cuenta la concentración nominal proporcionada como valor de consenso en el ensayo de intercomparación.

Para el estudio de exactitud a nivel medio y alto, se estudia la recuperación sobre muestras adicionadas (nivel medio equivalente a 1500 ng/g o 2250 ng/filtro y nivel alto equivalente 10000 ng/g o 15000 ng/filtro). Cada una de las muestras adicionadas se prepara por triplicado.

En la [Tabla 118] se presentan los resultados de recuperación a los tres niveles de concentración estudiado.

Tabla 118. Resultados del estudio de exactitud del procedimiento de determinación de los HAPs en muestras de aire ambiente. Se incluyen los valores de recuperación promedio, a nivel bajo (n=6) y nivel medio-alto (n=3).

| Compuesto | NIVEL BAJO hasta 300 ng/filtro |
|----------------------|-----------------------------------|
| | R% _{promedio} (n=6) |
| Benzo(a)antraceno | 99,7 |
| Benzo(j)fluoranteno | 103,8 |
| Benzo(b)fluoranteno | 102,6 |
| Benzo(k)fluoranteno | 104,0 |
| Benzo(a)pireno | 100,7 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 107,5 |
| Indeno(123-cd)pireno | 102,2 |

| Compuesto | NIVEL MEDIO aprox. 2250 ng/filtro | | NIVEL ALTO aprox. 15000 ng/filtro | | R% _{promedio} [nivel medio- alto] |
|----------------------|--------------------------------------|--------------|--------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------|
| | R% _{promedio} (n=3) | CV% (n=3) | R% _{promedio} (n=3) | CV% (n=3) | |
| Benzo(a)antraceno | 102,1 | 6,2 | 96,9 | 2,5 | 99,5 |
| Benzo(j)fluoranteno | 92,0 | 6,3 | 90,9 | 2,2 | 91,5 |
| Benzo(b)fluoranteno | 109,2 | 4,5 | 99,2 | 2,7 | 104,2 |
| Benzo(k)fluoranteno | 85,7 | 6,9 | 89,0 | 2,8 | 87,3 |
| Benzo(a)pireno | 76,5 | 10,4 | 76,9 | 5,4 | 76,7 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 78,1 | 15,3 | 82,4 | 6,4 | 80,2 |
| Indeno(123-cd)pireno | 82,3 | 6,1 | 92,1 | 2,0 | 87,2 |

Los resultados de recuperación obtenidos para los 7 HAPs a estudio se encuentran, en todos los casos, entre el 70% y el 130%, asegurando que el procedimiento es exacto en el rango de concentraciones de trabajo. Sin embargo, es importante tener en cuenta, que los resultados de recuperación más bajos obtenidos corresponden al BaP, por lo que se puede podría plantear la posibilidad de corregir los resultados obtenidos por esta recuperación promedio ($R(\text{BaP}) = 77\%$) cuando la muestra se encuentra a concentraciones medias o altas.

• Rango de trabajo del procedimiento

Teniendo en cuenta los resultados del estudio de linealidad, de precisión y exactitud del procedimiento, se puede decir que el rango de trabajo del procedimiento es el siguiente:

- De 20 ng/filtro a 20000 ng/filtro para BaA, BbF, BkF, BaP y DiBaA. Para un volumen de aire muestreado de 1000 m³, el intervalo de trabajo incluye de 0,02 a 20 ng/m³.
- De 30 ng/filtro a 20000 ng/filtro para BjF e IP. Para un volumen de aire muestreado de 1000 m³, el intervalo de trabajo incluye de 0,03 a 20 ng/m³.

- **Incertidumbre del procedimiento**

Tal y como se ha comentado, se propone calcular la incertidumbre del procedimiento a partir de los resultados de validación.

Así, la incertidumbre se calcula como la raíz cuadrada de la suma cuadrática de la incertidumbre asociada al patrón, al sistema instrumental y a la muestra [Ecuación 13].

$$u = \sqrt{u_{\text{patrón cuantificación}}^2 + u_{\text{sistema instrumental}}^2 + u_{\text{muestra}}^2}$$

*Ecuación 13. Fórmula de la incertidumbre combinada de un procedimiento.
(M. Quintela, J. Báguena, G. Gotor, M.J. Blanco, F., 2011)*

La incertidumbre asociada al patrón ($u_{\text{patrón}}$) depende de la incertidumbre asociada a la tolerancia del patrón (proporcionada por el fabricante para el lote de PAH MIX9 utilizado en la validación o al patrón de BjF) y a la preparación por dilución. La incertidumbre asociada al sistema instrumental ($u_{\text{instrumento}}$) depende de la exactitud y de la precisión asociada al método de cálculo con el sistema de HPLC-FLU. Finalmente, la incertidumbre asociada a la muestra (u_{muestra}), incluye tanto la exactitud como la precisión, resultados obtenidos directamente de los dos parámetros de validación. En este caso, no se considera la preparación de la muestra ya que está incluido dentro de la precisión del procedimiento, que implica seis preparaciones independientes. Todos los sumandos se expresan como errores relativos (en %) para evitar cualquier problema que pudiera ocasionar un cambio de unidades.

Para el cálculo de la **incertidumbre del patrón de cuantificación** es necesario tener en cuenta que:

- La tolerancia del patrón conjunto PAH MIX 9 de 100 mg/L, proporcionada para todos los HAPs excepto para el BjF, es del 5%. Así, la incertidumbre asociada a la tolerancia del patrón será para todos los HAPs, excepto para el BjF:

$$u_{\text{tolerancia}}(\%) = \frac{5\%}{\sqrt{3}} = 2,89 \%$$

- En el caso del benzo(j)fluoranteno, se debe tener en cuenta, tanto la tolerancia del patrón de benzo(j)fluoranteno sólido como la dilución para preparar el patrón de 100 mg/L.

La riqueza del patrón sólido es del 99%, así su tolerancia es del 1% y su incertidumbre asociada es la siguiente:

$$u_{\text{tolerancia}}(\%) = \frac{1}{\sqrt{3}} = 0,29 \%$$

La incertidumbre asociada a la dilución para preparar el patrón de 100 mg/L, depende de tanto de la incertidumbre asociada a la pesada de 5,00 mg como de la dilución en el

matraz de 50,0 mL. Se calcula siguiendo la expresión [Ecuación 14]. El resultado obtenido, en este caso es de 0,12%.

$$u_{\text{patrón}}(\%) = \sqrt{u_{\text{pesada}}^2 + u_{\text{enrase}}^2} = \sqrt{\left(\frac{A/2}{\text{gramos de patrón}}\right)^2 + \left(\frac{T/2}{\text{mL enrase}}\right)^2}$$

Donde

A: tolerancia de calibración de la balanza ($A=0,0005$ g);

T: tolerancia del material volumétrico utilizado obtenido en la norma ISO 1042 (T (matraz 10,0 mL) = 0,025 mL; T (matraz 25,0mL)=0,040 mL; T (matraz 50,0mL)=0,060 mL; T (matraz 100,0 mL)=0,10 mL). (UNE-EN-ISO 1042, 1998)

Ecuación 14. Fórmula de la incertidumbre asociada a un patrón (general)

Así, para el patrón concentrado de B_jF de 100 mg/L, su incertidumbre asociada es del 0,31%, calculada como suma cuadrática de las incertidumbres asociadas al patrón sólido y a su dilución.

- La incertidumbre asociada a la preparación varía en función del patrón de calibración, pero en todos los casos se calcula de la misma manera. Como los patrones, se preparan por dilución desde un patrón de 1000 ng/mL, primero se calcula la incertidumbre asociada a la preparación del patrón de 1000 ng/mL, considerando la incertidumbre de la pesada del volumen de dilución y la asociada al volumen de dilución. Y después la incertidumbre de cada uno de los otros patrones diluidos.

Finalmente, la incertidumbre de preparación de cada patrón corresponde a la incertidumbre combinada de la suma cuadrática de la incertidumbre asociada a la tolerancia del patrón, la incertidumbre de preparación del patrón de 1000 ng/mL y la incertidumbre asociada a cada una de las diluciones correspondientes a los patrones diluidos. El margen de calibración se separa en tres niveles: nivel bajo (10 ng/mL), nivel medio (40 y 80 ng/mL) y nivel alto (200, 400 y 1000 ng/mL). En cada caso, se incluye la incertidumbre del patrón más diluido, que correspondería con el caso más desfavorable, es decir, con mayor incertidumbre asociada. Los resultados se presentan en la [Tabla 119].

Tabla 119. Incertidumbre asociada a la preparación de los patrones de cuantificación. Esta incertidumbre coincide para todos los HAPs a estudio.

| Para BaA, BbF, BkF, BaP, DiBahA e IP | | | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------|
| Patrón cuantificación | u _{tolerancia} (%) | u _{patrón madre} (%) [1000 ng/mL] | u _{patrón diluida} (%) [ng/mL] | u _{patrón cuantificación} (%) |
| NIVEL BAJO 10 ng/mL | 2,89 | 0,33 | 0,19 | 2,91 |
| NIVEL MEDIO 40 ng/mL | 2,89 | 0,33 | 0,086 | 2,91 |
| NIVEL ALTO 200 ng/mL | 2,89 | 0,33 | 0,082 | 2,91 |
| Para BjF | | | | |
| Patrón cuantificación | u _{PATRON 100 mg/L} (%) | u _{patrón madre} (%) [1000 ng/mL] | u _{patrón diluida} (%) [ng/mL] | u _{patrón cuantificación} (%) |
| NIVEL BAJO y MEDIO | 0,31 | 0,33 | 0,19 0,086 | 0,46 |
| NIVEL ALTO | 0,31 | 0,33 | 0,082 | 0,49 |

Para el cálculo de la **incertidumbre del sistema instrumental** se considera, tanto la exactitud como la precisión relacionadas con el instrumento, utilizado para la cuantificación de las muestras.

Así, se tiene en cuenta que:

- La incertidumbre asociada a la precisión del instrumento (u_{precisión instrumental}) corresponde al coeficiente de variación (CV%) obtenido en el estudio de la repetibilidad de inyección para cada uno de los HAPs [Ecuación 15].

$$u_{\text{precisión instrumental}} = \frac{CV\%}{\sqrt{n = 3}}$$

Ecuación 15. Fórmula aplicada para el cálculo de la incertidumbre asociada a la precisión del sistema instrumental.

En la [Tabla 120] se presentan los resultados de incertidumbre de la precisión del sistema instrumental, para cada uno de los analitos, a cada uno de los niveles de concentración en los que se ha separado el rango de calibración.

Tabla 120. Incertidumbre asociada a la precisión del sistema instrumental.

| Compuestos | NIVEL BAJO 10 ng/mL | | NIVEL MEDIO 40 y 80 ng/mL | | NIVEL ALTO 200 a 1000 ng/mL | |
|----------------------|------------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | CV% | $u_{\text{precisión}}$ (SI) | CV% | $u_{\text{precisión}}$ (SI) | CV% | $u_{\text{precisión}}$ (SI) |
| Benzo(a)antraceno | 0,42 | 0,24 | 0,48 | 0,28 | 0,61 | 0,35 |
| Benzo(j)fluoranteno | 1,30 | 0,75 | 0,93 | 0,54 | 0,51 | 0,29 |
| Benzo(b)fluoranteno | 0,87 | 0,50 | 0,54 | 0,31 | 1,2 | 0,69 |
| Benzo(k)fluoranteno | 0,33 | 0,19 | 0,23 | 0,13 | 0,32 | 0,18 |
| Benzo(a)pireno | 0,37 | 0,21 | 0,38 | 0,22 | 1,3 | 0,75 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 0,98 | 0,57 | 0,49 | 0,28 | 1,4 | 0,81 |
| Indeno(123-cd)pireno | 1,50 | 0,87 | 0,75 | 0,43 | 0,59 | 0,34 |

Donde SI: sistema instrumental

- Como el cálculo de los HAPs en las muestras, se realiza teniendo en cuenta el factor de respuesta promedio obtenido de los patrones de calibración, la exactitud asociada al instrumento se calcula como la diferencia entre el factor de respuesta obtenido a una determinada concentración y el factor de respuesta promedio. Así, el cálculo de la incertidumbre asociada a la exactitud del sistema instrumental ($u_{\text{exactitud instrumental}}$) se calcula a partir de la siguiente expresión [Ecuación 16].

$$u_{\text{exactitud instrumental}} = \frac{|FR_i - FR_{\text{promedio}}|}{\sqrt{3}} \cdot \frac{100}{FR_{\text{promedio}}}$$

Ecuación 16. Fórmula aplicada para el cálculo de la incertidumbre asociada a la exactitud del sistema instrumental, en el procedimiento para el análisis de HAP en muestras de aire ambiente.

A cada rango de trabajo, se escoge el valor máximo y más desfavorable, para el cálculo de la incertidumbre del sistema instrumental. En la [Tabla 121], se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 121. Incertidumbre asociada a la exactitud del sistema instrumental.

| Compuestos | NIVEL BAJO 10 ng/mL | NIVEL MEDIO 40 y 80 ng/mL | NIVEL ALTO 200 a 1000 ng/mL |
|----------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| | $u_{\text{exactitud}}$ (SI) | $u_{\text{exactitud}}$ (SI) | $u_{\text{exactitud}}$ (SI) |
| Benzo(a)antraceno | 0,23 | 0,55 | 0,79 |
| Benzo(j)fluoranteno | 1,15 | 0,85 | 1,19 |
| Benzo(b)fluoranteno | 1,03 | 0,87 | 0,96 |
| Benzo(k)fluoranteno | 0,06 | 0,58 | 0,73 |
| Benzo(a)pireno | 0,58 | 0,98 | 1,13 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 2,63 | 0,27 | 1,02 |
| Indeno(123-cd)pireno | 1,06 | 1,15 | 1,43 |

Donde SI: sistema instrumental

En la [Tabla 122Tabla 150], se presentan los valores de incertidumbre combinada asociada con el sistema instrumental, para cada uno de los HAPs a estudio a cada uno de los niveles de concentración. Se calcula a partir de la suma cuadrática de los resultados incluidos en la [Tabla 120] ($u_{\text{precisión instrumental}}$ %) y en la [Tabla 121] ($u_{\text{exactitud instrumental}}$ %), y se obtiene como el valor máximo de los tres niveles de concentración.

Tabla 122. Incertidumbre asociada a la preparación del patrón de cuantificación, tanto a nivel bajo como a nivel medio y alto. Esta incertidumbre coincide para todos los HAPs a estudio.

| Compuestos | NIVEL BAJO 10 ng/mL | NIVEL MEDIO 40 y 80 ng/mL | NIVEL ALTO 200 a 1000 ng/mL | $u_{\text{sistema instrumental}}$ (%) |
|----------------------|------------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| | $u_{\text{sistema instrumental}}$ (%) SI | | | (*) |
| Benzo(a)antraceno | 0,34 | 0,62 | 0,87 | 0,87 |
| Benzo(j)fluoranteno | 1,37 | 1,01 | 1,23 | 1,4 |
| Benzo(b)fluoranteno | 1,14 | 0,92 | 1,18 | 1,2 |
| Benzo(k)fluoranteno | 0,20 | 0,59 | 0,75 | 0,75 |
| Benzo(a)pireno | 0,61 | 1,00 | 1,36 | 1,4 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 2,69 | 0,39 | 1,30 | 2,7 |
| Indeno(123-cd)pireno | 1,37 | 1,23 | 1,47 | 1,5 |

Donde SI: sistema instrumental

() Valor máximo de los tres niveles de concentración*

Para el cálculo de la **incertidumbre de la muestra** se considera, tanto la exactitud como la precisión obtenidas en la validación.

Así, se tiene en cuenta que:

- La incertidumbre asociada a la precisión de la muestra ($u_{\text{precisión muestra}}$) corresponde al coeficiente de variación (CV%) obtenido en el estudio de precisión de la muestra para cada uno de los HAPs. Se aplicará la [Ecuación 15], pero en lugar de considerar $n=3$ se incluirá $n=6$.
- La incertidumbre asociada a la exactitud de la muestra ($u_{\text{exactitud muestra}}$) viene determinada por el sesgo obtenido en el estudio de exactitud. El sesgo corresponde a la diferencia entre la recuperación obtenida y el 100%. Para el cálculo de la incertidumbre se utilizará la [Ecuación 17].

$$u_{\text{exactitud muestra}} = \frac{\text{sesgo}\%}{\sqrt{3}}$$

Ecuación 17. Fórmula aplicada para el cálculo de la incertidumbre asociada a la exactitud asociada a la muestra

El sesgo se ha calculado considerando la recuperación promedio obtenidos a nivel medio y alto. No se ha considerado la adición a nivel bajo, ya que, los valores de recuperación obtenidos son más altos.

En la [Tabla 123], se presentan los valores de incertidumbre combinada asociada a la muestra, para cada uno de los HAPs a estudio.

Tabla 123. Incertidumbre asociada a la muestra para cada uno de los HAPs de estudio

| Compuestos | PRECISIÓN | | EXACTITUD | | u muestra (%) |
|----------------------|-----------|----------------------------|-----------|----------------------------|------------------|
| | CV% (*) | u _{precisión} (%) | Sesgo (%) | u _{exactitud} (%) | |
| Benzo(a)antraceno | 3,2 | 1,31 | 0,5 | 0,29 | 1,3 |
| Benzo(j)fluoranteno | 1,9 | 0,78 | 8,5 | 4,91 | 5,0 |
| Benzo(b)fluoranteno | 2,3 | 0,94 | 4,2 | 2,42 | 2,6 |
| Benzo(k)fluoranteno | 4,2 | 1,71 | 12,7 | 7,33 | 7,5 |
| Benzo(a)pireno | 2,2 | 0,90 | 23,3 (*) | 13,45 (*) | 13,5 (*) |
| | 2,2 | 0,90 | --- | --- | 0,90 (**) |
| Dibenzo(ah)antraceno | 9,7 | 3,96 | 19,8 | 11,43 | 12,1 |
| Indeno(123-cd)pireno | 2,4 | 0,98 | 12,8 | 7,39 | 7,5 |

(*) sin corrección de la recuperación (**) con corrección de la recuperación

En la [Figura 85], se presentan los resultados correspondientes a la incertidumbre asociada al patrón [Tabla 119], al sistema instrumental (SI) [Tabla 122] y a la muestra [Tabla 123], para cada uno de los siete analitos a estudio. A partir de estos valores, se calcula la incertidumbre global combinada (u_{global}). La incertidumbre expandida ($U_{\text{expandida}}$), se obtiene multiplicando el valor de la incertidumbre global por un factor de cobertura de 2 (nivel de confianza del 95%).

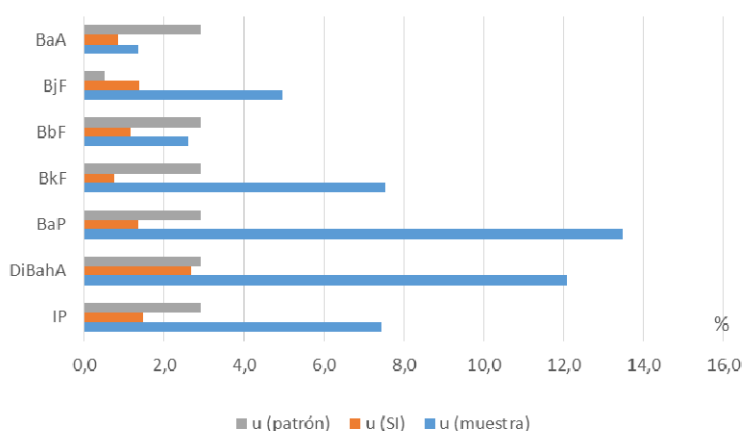


Figura 85. Representación de los valores de incertidumbre calculados al patrón [u (patrón)], al sistema instrumental [u (SI)] y a la muestra [u (muestra)], para cada uno de los analitos a estudio.

Como se puede observar, en la mayoría de los casos, el bloque de menor influencia es el sistema instrumental, a excepción de para el BbF que es el del patrón. Este se debe, a que todos los HAPs excepto el BbF se preparan a partir de un patrón conjunto en disolución cuya incertidumbre es mayor que cuando el patrón inicial es el sólido, aunque después se tenga que diluir. Sin embargo, el bloque de mayor influencia es el que está asociado a la muestra, excepto para el BaA que éste es muy bajo y le supera el del patrón.

En la [Tabla 124], se presenta tanto la incertidumbre combinada como la incertidumbre expandida, asociada a la determinación de cada uno de los HAPs (BaA, BbF, BkF, BaP, DiBahA e IP) en muestras de aire ambiente.

Tabla 124. Incertidumbre global y expandida, para cada uno de los HAPs en el procedimiento para la determinación de HAPs en el aire ambiente.

| Compuestos | U _{global} (%) | U _{expandida} (%) |
|----------------------|-------------------------|----------------------------|
| Benzo(a)antraceno | 3,3 | 6,6 |
| Benzo(j)fluoranteno | 5,2 | 10 |
| Benzo(b)fluoranteno | 4,1 | 8,2 |
| Benzo(k)fluoranteno | 8,1 | 16 |
| Benzo(a)pireno | 14 | 28 (*) |
| | 3,3 | 7 (**) |
| Dibenzo(ah)antraceno | 13 | 26 |
| Indeno(123-cd)pireno | 8,1 | 16 |

(*) Sin corrección de la recuperación (***) con corrección de la recuperación

Los valores de incertidumbre obtenidos para cada uno de los HAPs cumplen el criterio de aceptación establecido ($U_{expandida} < 30\%$ para BaP; $U_{expandida} < 40\%$ para otros HAPs).

6.1.4. Resumen de los resultados de validación del procedimiento para la determinación de los HAPs en muestras de aire ambiente.

A partir de los resultados obtenidos en el estudio de validación, se puede concluir que el procedimiento propuesto para la determinación de HAPs en muestras de aire ambiente por HPLC-FLU:

- Es **selectivo**, ya que no se detectan ni interferencias en los disolventes ni en el material ni en los filtros utilizados.
- Es **lineal** en el rango de concentraciones de 10 ng/mL a 1000 ng/mL.
- Tiene una **repetibilidad de inyección**, obtenida con patrones, inferiores al 3% para todos los HAPs a estudio.
- Los **límites de cuantificación** coinciden con el límite inferior del rango de trabajo, es decir, igual a 20 ng/filtro para BaA, BbF, BkF, BaP y DiBahA e igual a 30 ng/filtro para BjF e IP.
- Los **límites de detección** corresponden a 2 ng/filtro para BaA, BbF, BkF, BaP y DiBahA y 10 ng/filtro para BjF e IP.
- Es **exacto** y **preciso** para los HAPs, ya que se obtienen valores de recuperación para todos los HAPs entre el 70 y 130%, y coeficientes de variación son inferiores o iguales al 5% para el BaP y al 10% para el resto de los HAPs. Sin embargo, es importante destacar que la recuperación más baja obtenida es para el BaP, por lo que, se puede corregir los resultados obtenidos por su recuperación promedio ($R(\text{BaP}) = 77\%$) cuando se tienen concentraciones superiores a 1000 ng/filtro.
- La **incertidumbre expandida**, calculada a partir de los parámetros de validación, para cada uno de los HAPs son inferiores al 30%, siendo el valor más alto para el BaP. Sin embargo, si se corrige el resultado por la recuperación obtenida, el valor de incertidumbre expandida se reduce hasta tan solo un 7%.

6.2. ACTIVIDADES DE CONTROL CONTINUO DEL PROCEDIMIENTO

Como se ha comentado, un procedimiento acreditado por la norma ISO 17025:2005 debe incluir unas actividades de control continuo que permitan asegurar la correcta validez de los ensayos realizados. Las actividades propuestas en la norma corresponden con el análisis de materiales de referencia y la participación en ensayos interlaboratorio. A continuación se detalla cómo se llevan a cabo estos controles en el procedimiento para la determinación de HAPs en muestras de aire ambiente.

6.2.1. Uso regular de materiales de referencia certificados. Recalculo de la incertidumbre.

En la norma ISO 17025:2005, se propone el uso regular de materiales de referencia certificados.

Para el caso del análisis de HAPs en muestras de aire ambiente, existe un material de referencia certificado. Este se corresponde con el *NIST Standard Reference Material (SRM)[®] 1649b Urban Dust*. Este corresponde con material particulado atmosférico correspondiente a la zona urbana de Washington (periodo de captación de 1976 y 1977).

Cabe destacar, que como corresponde a muestras reales de fracción PM10 de un periodo largo de tiempo de captación en una zona urbana, tanto los HAPs como los otros contaminantes orgánicos presentes, se encuentran al nivel habitual de las muestras reales, por lo que se puede considerar un buen material de referencia. Sin embargo, como inconvenientes se puede destacar su elevado coste (aproximadamente 800 €) y la poca cantidad disponible (2 g), por estas razones, se limitará su uso a cuando sea estrictamente necesario.

La norma de referencia para la determinación de BaP en muestras de aire ambiente (norma UNE-EN 15549:2008), propone analizar el material de referencia certificado al menos cada seis meses. Esto se realiza así, cuando el volumen de muestras disponibles es elevado. Sin embargo, el equipo auditor de la entidad acreditadora ENAC, suele aceptar que el análisis de este material se realice una vez al año.

Se decide realizar el material de referencia con un doble objetivo:

- Controlar el procedimiento, tal y como se indica en la norma ISO 17025:2005. Con su análisis periódico es posible controlar la exactitud y precisión del procedimiento. Se fijan como criterios de aceptación los mismos que se incluyen en la validación para todos los HAPs

Exactitud → Recuperación: 70-130%

Precisión → CV% (n=3) ≤ 5% (BaP) y ≤ 10% (Resto de los HAPs)

- Recalcular la incertidumbre del procedimiento. Este recalcular de la incertidumbre se podría llevar a cabo volviendo a validar, total o parcialmente el procedimiento. Pero, en este caso, debido a la disponibilidad de la muestra de referencia y a la necesidad de su uso periódico, se propone hacer el recalcular de la incertidumbre con el SRM®. La nueva incertidumbre expandida, también debe cumplir con el criterio de aceptación establecido en el protocolo de validación, es decir, para BaP la $U_{\text{expandida}}$ debe ser inferior o igual al 30% y para el resto de los HAPs inferior o igual al 40%.

- **Control de la exactitud y la precisión a partir de los resultados de la SRM® 1649b Urban Dust.**

Para el análisis del SRM® 1649b Urban Dust se propone tomar unos 100 mg de muestra y prepararla por triplicado. De esta manera, es posible valorar tanto la exactitud como la precisión del procedimiento. Así, se toma la cantidad de SRM® y se introduce en una celda de ASE, perfectamente limpia. Se homogeniza con tierra de diatomeas. Es posible realizar la mezcla previamente en una cápsula de porcelana y después pasar la totalidad del contenido al interior de la celda. Rellenar la celda de ASE completamente con tierra y compactar la mezcla. Posteriormente, se procede siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5 del Capítulo III de la presente tesis [página 259].

En la [Tabla 125] y la [Tabla 126], se presentan los resultados de precisión y exactitud, respectivamente, obtenidos en uno de los análisis realizados de la SRM® 1649b Urban Dust.

Tabla 125. Estudio de precisión a partir de los resultados de la SRM®1649b Urban Dust.

| Compuestos | Concentración (ng/g) | | | ng/g promedio | CV% n=3 |
|----------------------|----------------------|-------|-------|---------------|------------|
| | SRM-1 | SRM-2 | SRM-3 | | |
| Benzo(a)antraceno | 1,99 | 1,93 | 1,93 | 1,95 | 1,8 |
| Benzo(j)fluoranteno | 2,04 | 2,19 | 2,15 | 2,13 | 3,7 |
| Benzo(b)fluoranteno | 5,88 | 5,65 | 5,77 | 5,77 | 2,0 |
| Benzo(k)fluoranteno | 1,77 | 1,72 | 1,75 | 1,75 | 1,7 |
| Benzo(a)pireno | 2,79 | 2,67 | 2,75 | 2,74 | 2,3 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 0,30 | 0,28 | 0,29 | 0,29 | 4,2 |
| Indeno(123-cd)pireno | 3,07 | 3,06 | 3,08 | 3,07 | 0,3 |

Tabla 126. Estudio de exactitud a partir de los resultados de la SRM®1649b Urban Dust.

| Compuestos | ng/g promedio | Valor de referencia (*) | R% |
|----------------------|---------------|-------------------------|------------|
| Benzo(a)antraceno | 1,95 | 2,09 | 93 |
| Benzo(j)fluoranteno | 2,13 | 1,73 | 81 |
| Benzo(b)fluoranteno | 5,77 | 5,99 | 96 |
| Benzo(k)fluoranteno | 1,75 | 1,75 | 100 |
| Benzo(a)pireno | 2,74 | 2,47 | 111 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 0,29 | 0,29 | 100 |
| Indeno(123-cd)pireno | 3,07 | 2,96 | 104 |

(*) El valor real o de referencia se obtiene de las concentraciones certificadas en el SRM 1649b

Como se puede observar, los resultados de precisión y exactitud de la SRM® 1649b Urban Dust, cumplen con los criterios de aceptación de precisión y exactitud exigidos para el procedimiento.

Además de corroborar la adecuación de los resultados obtenidos al aplicar el PNT, el uso de SRM permite comprobar la vigencia de los criterios establecidos como controles de calidad (QCs) en el método.

- **Recalculo de la incertidumbre a partir de los resultados de la SRM®1649b Urban Dust.**

Para el recalcu de la incertidumbre del procedimiento a partir del análisis de la SRM® 1649b Urban Dust, se debe tener en cuenta los siguientes factores:

- **La incertidumbre del SRM®.** En este caso, se corresponde con la incertidumbre de la tolerancia del propio material de referencia (u_{SRM}).

En el certificado de análisis disponible, se incluye la concentración de cada uno de los HAPs expresada como un valor promedio y un margen que representa la tolerancia ($X \pm C$ en ng/g). Así, el cálculo de la incertidumbre se realiza siguiendo la [Ecuación 18]

$$u_{\text{precisión SRM}} (\%) = \frac{c}{2} \cdot \frac{100}{x}$$

Ecuación 18. Fórmula aplicada para el cálculo de la incertidumbre asociada a la precisión del SRM®.

En la [Tabla 127], se presentan los resultados de la incertidumbre asociada a la tolerancia del SRM® 1649b Urban Dust.

Tabla 127. Incertidumbre de la tolerancia del propio SRM®1649b Urban Dust.

| Compuestos | X - Valor de referencia (*) ng/g | C tolerancia (*) ng/g | u_{SRM} (%) |
|----------------------|-------------------------------------|--------------------------|---------------|
| Benzo(a)antraceno | 2,092 | 0,048 | 1,15 |
| Benzo(j)fluoranteno | 1,731 | 0,083 | 2,40 |
| Benzo(b)fluoranteno | 5,99 | 0,20 | 1,67 |
| Benzo(k)fluoranteno | 1,748 | 0,083 | 2,37 |
| Benzo(a)pireno | 2,47 | 0,17 | 3,44 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 0,290 | 0,004 | 0,69 |
| Indeno(123-cd)pireno | 2,96 | 0,17 | 2,87 |

(*) Valores obtenidos de las concentraciones certificadas en el SRM 1649b

- **La incertidumbre asociada a la cuantificación** que incluye el sistema instrumental y del patrón de trabajo ($u_{\text{cuantificación}}$).

En este caso, para el cálculo, se tienen en cuenta los resultados obtenidos en el test de idoneidad realizado antes de analizar las muestras de referencia. Cabe destacar, que se inyectan los patrones de calibración desde 10 ng/mL a 1000 ng/mL. Además, se inyectan

por duplicado, antes y después de las muestras. Así, se calcula la precisión del sistema instrumental con el coeficiente de variación (%) obtenido para cada analito, en el estudio de la repetibilidad de inyección. Para la exactitud, se calcula de la misma manera que se ha realizada en la validación, es decir, considerando la diferencia entre el factor de respuesta promedio (utilizado en el cálculo de la concentración) y el factor de respuesta a cada nivel de concentración. La incertidumbre de exactitud corresponderá a la diferencia máxima obtenida en cada caso.

En lo que hace referencia al patrón de trabajo, la incertidumbre coincide con los resultados incluidos en la validación.

Así, en la [Tabla 128], se presenta directamente el valor de incertidumbre asociada a la cuantificación considerando tanto la incertidumbre del patrón de cuantificación como la del sistema instrumental.

Tabla 128. Incertidumbre asociada a la cuantificación del SRM® que incluye tanto el patrón de trabajo como el sistema instrumental.

| Compuestos | $u_{\text{patrón}} (\%)$ | $u_{\text{instrumento}} (\%)$ | $u_{\text{cuantificación}} (\%)$ |
|----------------------|--------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Benzo(a)antraceno | 2,91 | 0,41 | 2,94 |
| Benzo(j)fluoranteno | 0,49 | 2,1 | 2,16 |
| Benzo(b)fluoranteno | 2,91 | 0,71 | 3,00 |
| Benzo(k)fluoranteno | 2,91 | 0,41 | 2,94 |
| Benzo(a)pireno | 2,91 | 1,2 | 3,15 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 2,91 | 1,5 | 3,27 |
| Indeno(123-cd)pireno | 2,91 | 1,6 | 3,32 |

- **La incertidumbre asociada a la muestra.** Se incluyen los resultados de exactitud y precisión obtenidos al analizar por triplicado la SRM®1649b Urban Dust.

En la [Tabla 142], se presentan los resultados obtenidos, detallando la incertidumbre de precisión y exactitud de la muestra, incluidos en la incertidumbre de la muestra (u_{muestra} (%)).

Tabla 129. Incertidumbre asociada a la muestra SRM® 1649b Urban Dust

| Compuestos | PRECISIÓN | | EXACTITUD | | $u_{\text{muestra}} (\%)$ |
|----------------------|------------|-----------------------------|-----------|-----------------------------|---------------------------|
| | CV% (*) | $u_{\text{precisión}} (\%)$ | Sesgo (%) | $u_{\text{exactitud}} (\%)$ | |
| Benzo(a)antraceno | 1,8 | 1,04 | 7 | 4,0 | 4,17 |
| Benzo(j)fluoranteno | 3,7 | 2,14 | 19 | 11,0 | 11,2 |
| Benzo(b)fluoranteno | 2,0 | 1,15 | 4 | 2,3 | 2,58 |
| Benzo(k)fluoranteno | 1,7 | 0,98 | -- | -- | 0,98 |
| Benzo(a)pireno | 2,3 | 1,33 | 11 | 6,4 | 6,49 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 4,2 | 2,42 | -- | -- | 2,42 |
| Indeno(123-cd)pireno | 0,3 | 0,17 | 4 | 2,3 | 2,32 |

A partir de la incertidumbre del SRM[®], de cuantificación y de la muestra, se calcula la incertidumbre global combinada (u_{global}) para cada uno de los analitos a estudio, como la raíz cuadrada de la suma cuadrática de cada uno de estos factores. La incertidumbre expandida ($U_{\text{expandida}}$), se obtiene multiplicando el valor de la incertidumbre combinada por un factor de cobertura de 2 (nivel de confianza del 95%). Los resultados se presentan en la [Tabla 130]

Tabla 130. Incertidumbre global y expandida, para cada uno de los HAPs en el procedimiento para la determinación de estos contaminantes en el aire ambiente.

| Compuestos | u_{global} (%) | $U_{\text{expandida}}$ (%) |
|----------------------|-------------------------|----------------------------|
| Benzo(a)antraceno | 5,2 | 11 |
| Benzo(j)fluoranteno | 12 | 24 |
| Benzo(b)fluoranteno | 4,3 | 8,6 |
| Benzo(k)fluoranteno | 3,9 | 7,8 |
| Benzo(a)pireno | 8,0 | 16 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 4,1 | 8,3 |
| Indeno(123-cd)pireno | 5,0 | 9,9 |

Como se puede observar, los valores de incertidumbre obtenidos para cada uno de los HAPs cumplen el criterio de aceptación establecido durante la validación ($U_{\text{expandida}} < 30\%$ para BaP; $U_{\text{expandida}} < 40\%$ para otros HAPs).

En la [Tabla 131], se presenta el resultado de la SRM[®] 1649b *Urban Dust*. Se incluye el resultado promedio obtenido de las tres determinaciones de la muestra y el intervalo de confianza calculado como el valor de incertidumbre expandida, expresado en ng/g.

Tabla 131. Resultados de la muestra SRM[®] 1649b Urban Dust, expresado como rango (ng/g).

| Compuestos | ng/g promedio (n=3) | IC ($u_{\text{expandida}}$ ng/g) | Rango ng/g | Valor de referencia (*) |
|----------------------|---------------------|-----------------------------------|---------------|-------------------------|
| Benzo(a)antraceno | 1,95 | 0,20 | [1,75 - 2,15] | 2,092 |
| Benzo(j)fluoranteno | 2,13 | 0,50 | [1,63 - 2,63] | 1,731 |
| Benzo(b)fluoranteno | 5,77 | 0,50 | [5,27 - 6,27] | 5,99 |
| Benzo(k)fluoranteno | 1,75 | 0,14 | [1,61 - 1,89] | 1,748 |
| Benzo(a)pireno | 2,74 | 0,44 | [2,30 - 3,18] | 2,47 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 0,29 | 0,02 | [0,27 - 0,31] | 0,290 |
| Indeno(123-cd)pireno | 3,07 | 0,30 | [2,77 - 3,37] | 2,96 |

(*) Valores obtenidos de las concentraciones certificadas en el SRM 1649b

Como se puede observar, el rango de concentraciones para cada uno de los analitos incluye el valor concentración de referencia. Así, se asegura la validez de los resultados en el análisis de HAPs en muestras de aire ambiente. Además, los valores de incertidumbre incluidos en la [Tabla 130], serían los que se entregarían al cliente, en caso de que se considerara necesario

6.2.2. Participación en ejercicios de intercomparación o programas de ensayos de aptitud.

Actualmente, no existen ensayos de aptitud para la determinación de HAPs en muestras de aire ambiente. Los únicos que se conocen referentes a este tipo de muestras, son para análisis de metales y utilizan filtros blancos con adición de patrón del analito de interés, pero sin la propia matriz del material particulado. De manera, que la efectividad de la extracción y el efecto matriz no están considerados.

Es por esta razón, que el Laboratorio de la Agencia de Salud Pública de Barcelona junto con el *Departament de Territori i Sostenibilitat de la Generalitat de Catalunya* han considerado necesario organizar ensayos de aptitud entre los laboratorios que realizan análisis de contaminantes en aire ambiente. Este ensayo de aptitud se ha realizado en tres ocasiones: en el año 2006, 2010 y 2015 e IQS ha participado en todas las ocasiones en las que se ha llevado a cabo. Es importante destacar, que a lo largo de las diferentes convocatorias el número de laboratorios que han participado ha ido aumentando.

En el año 2006 el número de participantes era de tan sólo tres, por lo que los resultados obtenidos fueron informativos. En el año 2010, la participación ya aumentó hasta 15 laboratorios, aunque como el ensayo incluye tanto análisis de HAPs como de metales, los laboratorios que entregarán resultados de HAPs, no llegaban ni a la mitad del total de participantes. No ha sido hasta este año 2015, donde los laboratorios que han entregado resultados de HAPs han llegado hasta 13 participantes. Por lo que los resultados del ejercicio de intercomparación ya permiten sacar conclusiones en lo que hace referencia a la variabilidad de los resultados y pueden tratarse estadísticamente de una forma adecuada.

Así, en este apartado, se incluye el ejercicio realizado en el año 2015.

La muestra para el ensayo de aptitud, corresponde al material particulado obtenido a partir de restos de muestras reales de filtros de fibra de cuarzo procedentes del muestreo de la fracción PM10 del material particulado, de distintas estaciones de captación integradas en la red de Catalunya y proporcionadas por el *Departament de Territori i Sostenibilitat de la Generalitat de Catalunya*. La preparación de las muestras para este ensayo de aptitud se realizó de la siguiente manera:

Los distintos filtros con material particulado fueron finamente triturados mediante un molinillo de gran capacidad con aspas de acero inoxidable. La muestra obtenida, previamente homogeneizada, se introdujo en un contenedor de mayor volumen para su agitación. Posteriormente, se subdividió en tubos de polipropileno de unos 25 mL de capacidad con tapón de rosca y se almacenaron protegidos de la luz.

Para estudiar la homogeneidad, se seleccionaron, de manera aleatoria, 10 viales de muestra y fueron analizados por duplicado. La estabilidad se confirmó 4 meses sin observarse variaciones significativas.

Para cada analito se entrega un único resultado expresado en ng/g. En la [Tabla 132], se presentan los resultados entregados por IQS en este ensayo de aptitud y sus valores de z-score obtenidos en cada caso. Además, también se incluye, para cada analito, el número de laboratorios que ha entregado resultado, el valor de consenso (o valor de referencia) asignado y la desviación estándar.

Cabe destacar, que el valor de z-score es el indicador utilizado en el ensayo para valorar estadísticamente el rendimiento del test de aptitud. Éste valor se calcula según la [Ecuación 19]

$$z - score = \frac{\text{valor obtenido} - \text{valor de consenso}}{\text{desviación estándar}}$$

Ecuación 19. Fórmula aplicada para el cálculo del valor de z-score en el ensayo de aptitud de HAPs en muestras de aire ambiente

El valor de consenso o valor de referencia se ha realizado siguiendo las recomendaciones del Protocolo Internacional Armonizado de la IUPAC. A partir de los resultados aportados por los laboratorios, sin considerar los resultados anómalos (a partir de $\pm 50\%$ de la mediana), se calcula el valor asignado como la media empleando el algoritmo robusto.

Para la asignación de la precisión diana se ha realizado una evaluación objetiva (desviación estándar del ejercicio interlaboratorio, σ). La desviación estándar del ejercicio, se ha calculado a partir de la ecuación de Horwitz-Thompson, teniendo en cuenta la concentración (C en $\mu\text{g/g}$) a la que se encuentran los diferentes analitos según la [Ecuación 20]

$$\sigma = \frac{0,02 \cdot (C10^{-6})^{0,8495}}{10^{-6}}$$

Ecuación 20. Ecuación de Horwitz-Thompson para el cálculo de la desviación estándar de forma objetiva

Tabla 132. Resultados entregados por IQS en el ensayo de aptitud de 2015 correspondiente al análisis de HAPs en muestras de aire ambiente. Incluye valoración con z-score.

| Compuestos | ng/g IQS | Nº resultados (aberrantes) | Valor consenso | Desviación estándar | Z-score |
|----------------------|--------------|----------------------------|----------------|---------------------|-------------|
| Benzo(a)antraceno | 107,7 | 13 (-2) | 126,6 | 29,98 | -0,7 |
| Benzo(b)fluoranteno | 334,4 | 12 (-2) | 308,8 | 41,16 | 0,4 |
| Benzo(k)fluoranteno | 150,0 | 13 (-3) | 142,8 | 12,66 | 0,2 |
| Benzo(a)pireno | 390,7 | 13 (2) | 316,6 | 50,57 | 1,2 |
| Dibenzo(ah)antraceno | 23,4 | 13 (*) | 64,84 (*) | 31,47 | --- |
| Indeno(123-cd)pireno | 407,2 | 12 (2) | 387,6 | 79,07 | 0,3 |

(*) No se calcula el Z-score porque la relación entre la incertidumbre y la precisión diana superan el criterio de aceptación (la relación $(\text{incertidumbre}/\sigma)^2 \leq 0,1$) debido a la elevada dispersión de los resultados recibidos

Como se puede observar en la [Tabla 132]:

- El número de resultados reportados para todos los HAPs a estudio son suficientes para cumplir los indicadores de calidad del ejercicio. El único caso en que no se han podido valorar los resultados ha sido para el DiBahA consecuencia de la elevada dispersión de los resultados recibidos. Esta dispersión puede ser debida a que el DiBahA es el compuesto que se encuentra en menor concentración en la muestra y, además, se conoce la presencia de una interferencia justo delante del pico de interés que puede provocar que se entreguen resultados por exceso.
- A los resultados entregados por IQS para todos los HAPs que han podido ser evaluados, les corresponde un valor de z-score inferior a 2. De manera que todos los resultados son satisfactorios ($z < 2$) o muy satisfactorios ($z < 1$). De esta manera, se corrobora que el procedimiento para la determinación de HAPs en aire ambiente es adecuado para el uso propuesto, dando validez a los resultados reportados.

A partir de los resultados del ensayo de aptitud, es posible calcular la exactitud del procedimiento, considerando como valor verdadero el valor de consenso. En la [Tabla 133] se presentan los valores de recuperación obtenidos para cada uno de los analitos. Como se puede observar, todos los resultados cumplen el criterio de aceptación de exactitud del procedimiento (70-130%). Sin embargo, en este caso, como sólo se entrega un resultado no es posible valorar la precisión del procedimiento.

Tabla 133. Valoración de la exactitud del procedimiento para la determinación de HAPs en muestras de aire ambiente, a partir de los resultados del ensayo de aptitud, considerando como valor real el valor de consenso.

| Compuestos | R% |
|----------------------|------------|
| Benzo(a)antraceno | 85 |
| Benzo(b)fluoranteno | 108 |
| Benzo(k)fluoranteno | 105 |
| Benzo(a)pireno | 123 |
| Dibenzo(ah)antraceno | --- |
| Indeno(123-cd)pireno | 105 |

7. ANÁLISIS DE HAPs EN LAS MUESTRAS DE AIRE AMBIENTE CORRESPONDIENTES A LA XVPCA.

La contaminación del aire es un proceso que se inicia de las emisiones de los diferentes focos de contaminantes a la atmósfera. La atmósfera es un medio fluido que provoca que la dispersión y el transporte de los contaminantes sea difícil de estudiar y de prever. Así, con la finalidad de minimizar la contaminación atmosférica es necesario controlar tanto las emisiones atmosféricas (niveles de emisión) como el control y la vigilancia de la presencia de los contaminantes en el aire en diferentes puntos receptores (niveles de inmisión). La combinación entre el nivel de inmisión y los parámetros meteorológicos permiten localizar el origen de los contaminantes.

La vigilancia de la calidad del aire consiste en la medida de las concentraciones de los diferentes contaminantes atmosféricos en diferentes puntos. Estos niveles reciben el nombre de niveles de inmisión. Éstos se controlan en Catalunya, mediante la *Xarxa de Vigilancia i Previsió de la Contaminació Atmosférica de Catalunya (XVPCA)*, que se extiende por todo el territorio catalán. Esta red, la forman todos los instrumentos de medida, tanto automáticos como manuales, capaces de medir y determinar los niveles de inmisión de los principales contaminantes de la zona. Los niveles de inmisión que no se deben sobrepasar para asegurar que no existan efectos negativos están legislados y deben cumplirse.

Entre los contaminantes atmosféricos que se controlan habitualmente son: SO₂, NO₂, O₃, H₂S, CO, HCl, Cl₂, Pb partículas totales en suspensión (PST, PM10 y PM2,5), compuestos orgánicos volátiles (benceno), metales pesados, entre otros. Cabe destacar, que desde el año 2008, con la entrada en vigor del RD 812/2008, se ha incorporado también el control de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.

Así, en el presente trabajo, y vinculados con los concursos públicos que IQS ha sido adjudicatario en los años 2008 y 2011, se han analizado las muestras correspondientes a los filtros de partículas PM10 obtenidas de los sensores integrados en la *Xarxa de Vigilancia i Previsió de la Contaminació Atmosférica de Catalunya*. En cada uno de los periodos (2008-2010 y 2011-2012), se han analizado unas 800 muestras, captadas en 16 de las estaciones distribuidas por Catalunya. Entre las muestras analizadas, no se incluyen las captadas en la ciudad de Barcelona ya que éstas están fuera de concurso, ya que son analizadas por la *Agencia de Salut Pública de Barcelona*.

Las estaciones de medida pueden clasificarse atendiendo al tipo de zona o a las fuentes emisoras predominantes. Conocer la procedencia de la captación puede ser interesante a la hora de estudiar tanto los niveles como las proporciones de los contaminantes a estudio, ya que, en cierta medida, pueden relacionarse con la fuente de emisión.

Así, atendiendo al tipo de zona, se pueden diferenciar estaciones urbanas, suburbanas o rurales. Se considera una zona urbana, aquella que está edificada de forma continua, mientras que suburbana es aquella zona que, a pesar de estar edificada, está separada por zonas no

urbanizadas (por pequeños lagos, bosques, tierras agrícolas, entre otros). El resto de zonas que no corresponden ni a urbana ni suburbana se consideraría de tipo rural.

Atendiendo a la fuente de emisión predominante se pueden destacar estaciones de tráfico, industriales o de fondo. Las estaciones situadas de tal manera que su nivel de contaminación está influenciado, principalmente, por las emisiones procedentes de una calle/carretera próxima, son consideradas de tráfico. Las estaciones industriales, son aquellas situadas en zonas cuyo nivel de contaminación depende principalmente de fuentes industriales. Las estaciones consideradas de fondo son las que no están influenciadas ni por las emisiones de tráfico ni por las industriales.

Las estaciones en las que se analizarán los HAPs han sido seleccionadas por el *Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya* (actual *Departament de Territori i Sostenibilitat (DTES)*). Para su selección, se ha tenido en cuenta la representatividad tanto geográfica como según tipo de estación. La selección está limitada en función del presupuesto destinado a este tipo de análisis y los resultados mínimos que se deben de tener por estación para que éstos sean suficientemente representativos. Se propone analizar 4 muestras por estación y mes de captación.

En la [Tabla 134] se presentan las estaciones de las que se han analizado muestras de HAPs. De cada estación, se incluye su clasificación o tipo de área atendiendo tanto a la zona (urbana, suburbana o rural) como a la fuente de emisión predominante (tráfico, industrial o de fondo). Además, se incluye el tipo de filtro (redondo o cuadrado) que se capta en cada una de las estaciones. En la tabla, también se incluye un número identificativo correlativo que se presenta en la [Figura 86] y que corresponde con la localización de cada uno de los municipios en el mapa de Catalunya.

Tabla 134. Estaciones de la XVPCA de las que se ha realizado el control de HAPs durante los años 2008-2011. Se incluye el municipio donde se sitúa la estación con el tipo de área de captación, el tipo de filtro captado en cada caso y el código de identificación que se incluye en la [Figura 86] para localizar los municipios dentro de la geografía catalana.

| ID [Figura 86] | Municipio (estación) | Tipo de área [Clasificación] | | Tipo de filtro (*) |
|-----------------------|-------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|--------------------|
| | | Según zona | Según fuente de emisión principal | |
| 1 | Bellver de la Cerdanya | Rural | Fondo | Redondo |
| 2 | Berga | Rural | Fondo | Redondo |
| 3 | Constantí | Suburbana | Industrial | Redondo |
| 4 | Igualada | Suburbana | Industrial | Cuadrado |
| 5 | La Bisbal d'Empordà | Suburbana | Fondo | Redondo |
| 6 | La Sénia | Rural | Fondo | Redondo |
| 7 | Lleida | Urbana | Tráfico | Redondo |
| 8 | Manlleu | Suburbana | Fondo | Cuadrado |
| 9 | Montcada i Reixac | Suburbana | Industrial | Cuadrado |
| 10 | Reus | Suburbana | Tráfico | Cuadrado |
| 11 | Sant Andreu de la Barca | Suburbana | Industrial | Cuadrado |
| 12 | Sant Celoni | Suburbana | Industrial | Cuadrado |
| 13 | Sort | Rural | Fondo | Redondo |
| 14 | Tiana | Suburbana | Fondo | Redondo |
| 15 | Tortosa | Rural | Tráfico | Cuadrado |
| 16 | Vilanova i la Geltrú | Urbana | Tráfico | Cuadrado |
| 17 | Vila-seca | Suburbana | Industrial | Cuadrado |

(*) A los filtros redondos les corresponde un volumen de captación/día superior a 540 m³ (típicamente de 700 m³/día), mientras que a los filtros cuadrados les corresponde un volumen superior a 1224 m³ (típicamente de 1600 m³)

En la [Figura 86], se presentan la situación geográfica de las estaciones de las que se han analizado muestras de HAPS.



Figura 86. Situación geográfica de los municipios de los que se han analizado muestras de HAPs.

7.1. SELECCIÓN DE LOS FILTROS PM10 PARA EL ANÁLISIS DE HAPs.

La selección de los filtros PM10 a analizar en cada una de las estaciones se realiza en IQS.

Según el DTES, de cada estación y mes de captación, se deben analizar un filtro blanco y, siempre que sea posible, cuatro muestras captadas.

El filtro blanco o blanco de proceso, corresponde a un filtro PM10 que ha sufrido el mismo proceso que las muestras captadas pero no ha sido muestreado. Así, se ha mantenido durante un determinado periodo de tiempo de muestreo, junto a las muestras que han sido muestreadas.

Del conjunto de filtros PM10 muestreados a lo largo de un mes de captación, se han seleccionado unos 4 filtros. Se decide tomar un filtro por semana intentando, siempre que sea posible, no coincidir en el día de captación y seleccionar siempre una muestra captada en un día de fin de semana. De esta manera, se quiere conseguir la máxima representatividad posible, a pesar de sólo seleccionar cuatro filtros al mes. Cabe destacar, que del total de filtros muestreados a lo largo de un mes de captación, se deben seleccionar tanto las muestras sobre las que se deben de determinar los HAPs como los metales, ya que ambos análisis son destructivos.

Así, una vez se reciben en IQS las muestras captadas en todas las estaciones de la XVPCA, se introducen en la cámara de acondicionamiento, donde se mantienen unas 48 horas antes de determinar su contenido de partículas según procedimiento normalizado. Una vez se realiza el

método gravimétrico y se conoce la concentración de material particulado por filtro, ya se pueden seleccionar las muestras para la determinación tanto de los HAPs como de los metales.

En el caso de los filtros seleccionados para la determinación de los HAPs, se mantienen en la misma cámara de acondicionamiento hasta el momento de su análisis, dentro de los mismos sobres en los que se ha recibido la muestra captada, para evitar que entre en contacto con la luz. Los filtros se analizan antes de transcurridos dos meses desde su día de captación.

En el primer periodo de análisis de HAPs en los filtros PM10 de la XVPCA (años 2008-2010), únicamente se seleccionan muestras coincidentes con los dos periodos estacionales principales: *verano*, que incluía muestras captadas los meses de junio, julio y agosto; e *invierno* que consideraba muestras de noviembre, diciembre y enero. En el concurso adjudicado el año 2011, se aumenta el volumen de muestras a analizar de alguna de las estaciones. De éstas, se toman muestras durante todo el año. Este concurso finaliza en marzo de 2012.

Así, se disponen muestras de los años 2009, 2010, 2011, 2012 (hasta marzo). Aunque hay estaciones que el número de muestras es más elevado porque, como se ha comentado, del año 2011 se tienen muestras de todos los meses.

En la [Tabla 135], se presentan los filtros de PM10 muestreados a los que se les ha determinado los HAPs. Se incluyen filtros PM10 captados desde noviembre de 2009 a marzo de 2012.

Tabla 135. Estaciones de la XVPCA de las que se ha realizado el control de HAPs durante los años 2008-2011. Se incluye el municipio donde se sitúa la estación, el tipo de área de captación y el número de muestras analizadas cada año de captación.

| Municipio (estación) | Tipo de área | Muestras | | | | TOTAL |
|-------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | 2009 (1) | 2010 (2) | 2011 (3) | 2012 (4) | |
| Bellver de la Cerdanya | Rural de fondo | 8 | 43 | 54 | 12 | 117 |
| Berga | Rural de fondo | 8 | 12 | 51 | 15 | 86 |
| Constantí | Suburbana Industrial | 8 | 15 | 53 | 15 | 91 |
| Igualada | Suburbana Industrial | 8 | 15 | 50 | 14 | 87 |
| La Bisbal d'Empordà | Suburbana de fondo | 8 | 16 | 54 | 11 | 89 |
| La Sénia | Rural de fondo | 7 | --- | --- | --- | 7 |
| Lleida | Urbana de tráfico | 8 | 47 | 51 | 14 | 120 |
| Manlleu | Suburbana de fondo | 8 | 44 | 44 | 13 | 109 |
| Montcada i Reixac | Suburbana Industrial | 8 | 46 | 54 | 14 | 122 |
| Reus | Suburbana de tráfico | 8 | 17 | --- | --- | 25 |
| Sant Andreu de la Barca | Suburbana Industrial | 8 | 17 | --- | --- | 25 |
| Sant Celoni | Suburbana Industrial | 8 | 46 | 44 | 14 | 112 |
| Sort | Rural de fondo | 8 | 16 | 17 | --- | 41 |
| Tiana | Suburbana de fondo | 8 | 15 | 51 | 14 | 88 |
| Tortosa | Rural de tráfico | 8 | 17 | 54 | 12 | 91 |
| Vilanova i la Geltrú | Urbana de tráfico | 8 | 16 | 58 | 10 | 92 |
| Vila-seca | Suburbana Industrial | 7 | --- | --- | --- | 7 |
| TOTAL muestras | | 134 | 382 | 635 | 158 | 1309 |

(1) **2009**: muestras de noviembre y diciembre.// (2) **2010**: muestras de dos periodos estacionales: invierno y verano // (3)-**2011**: muestras de todo el año // (4)- **2012**: muestras de los meses de enero-febrero y marzo

7.2. ESTUDIO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ANÁLISIS DE HAPs DE LOS FILTROS PM10 CORRESPONDIENTES A LA XVPCA.

De todas las muestras disponibles [Tabla 135], se decide descartar en el estudio de resultados las muestras correspondientes a las estaciones de La Sénia, Reus, Sant Andreu de la Barca, Sort y Vila-Seca, ya que se tienen menos muestras disponibles y, consecuentemente, tienen menor representatividad total.

De cinco estaciones, se dispone de unas 120 muestras: Bellver de la Cerdanya, Lleida, Montcada i Reixac, Manlleu i Sant Celoni. Estas son las estaciones de las que se disponen muestras de todo el año 2011. Del resto de estaciones se disponen de unas 90 muestras, que corresponden a periodos de invierno-verano, durante todos los años de muestreo.

El estudio de los resultados se focalizará en los siguientes puntos:

- La relación entre el total de partículas presentes en los filtros y la concentración total de los HAPs.
- La evolución de la concentración, tanto de BaP como del total de HAPs a lo largo de todo el periodo de muestreo, con la finalidad de detectar variabilidades estacionales.
- Comparación de la concentración de los HAPs y del BaP de cada una de las estaciones, con finalidad comparativa según tipo de estación o área de muestreo.
- La proporción de los 7 HAPs de las muestras según la estación o área de muestreo.

7.2.1. Estudio de la relación entre la concentración de partículas en los filtros y la concentración de HAPs.

En la [Figura 87], se representa la relación entre la concentración de partículas presentes en los filtros PM10 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) y su concentración de HAPs (ng/m^3). Se incluyen los resultados de todas las muestras captadas durante los años 2009 y 2010.

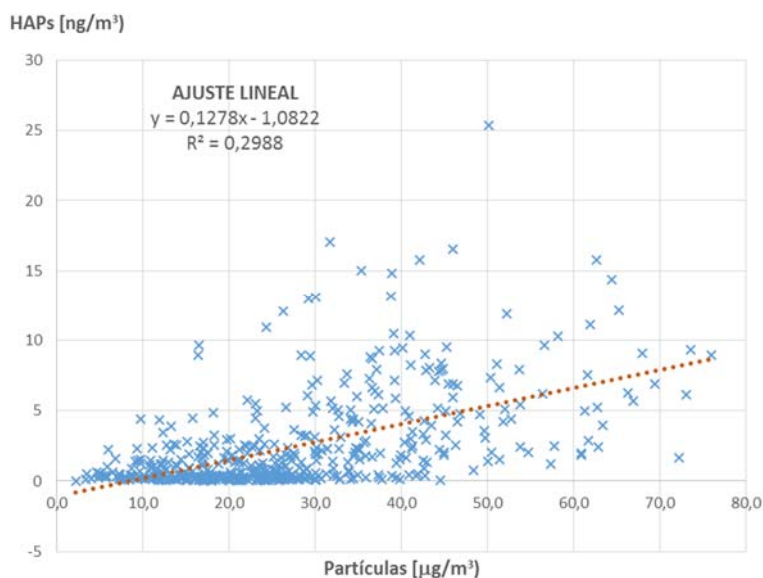


Figura 87. Representación de la relación entre la concentración de las partículas en los filtros PM10 y su concentración en HAPs [Muestras: 2009-2010].

Como se puede observar, no existe una relación lineal entre la concentración de partículas presentes en los filtros PM10 y su concentración de HAPs. Se podría considerar una tendencia pero no se cumple globalmente. Se descartan también ajustes de tipo logarítmico o cuadrático. Esto indicaría que la concentración de los HAPs es independiente de la concentración de partículas. En realidad, este resultado puede parecer lógico ya que, la concentración de los HAPs en los filtros dependerá, principalmente, del tipo de partículas que estén presentes en los filtros donde estos contaminantes han quedado adheridos después de su emisión a la atmósfera por una determinada fuente. Se cumpliría la relación si los HAPs fuesen igualmente afines a cualquier tipo de partículas de diámetro aerodinámico de entre 2,5 y 10 µm, y cabe destacar, que muchas de estas partículas son compuestos inorgánicos como silicatos, óxidos de aluminio o metales pesados, a los que los HAPs no son afines. Éstos quedarían adheridos principalmente a partículas tipo carbono.

7.2.2. Evolución de la concentración de los HAPs y del BaP en todo el periodo de muestreo. Estudio estacional.

El estudio de la evolución de la concentración de los HAPs (y de BaP) a lo largo de todo el periodo de muestreo, se decide realizar con las estaciones que se tienen más muestras disponibles para que éste sea más representativo.

De entre las cinco estaciones de las que se dispone de más muestras, se tiene una tipo rural de fondo (Bellver de la Cerdanya) otra de tipo suburbana de fondo (Manlleu), otra urbana de tráfico (Lleida) y dos de tipo suburbana industrial (Sant Celoni i Montcada i Reixac). Así, para este

estudio se decide trabajar con una estación de cada tipo, dejando descartada Sant Celoni, ya que se tienen menos muestras que de Montcada i Reixac.

De cada una de las estaciones consideradas, se calcula la concentración promedio de las cuatro muestras disponibles por mes de captación, tanto de HAPs como de BaP, de cada uno de los meses entre noviembre 2009 y marzo 2012. En la [Figura 88] y la [Figura 89], se presentan los gráficos obtenidos de la suma de los 7 HAPs a estudio y sólo del BaP, expresados en ng/m³, para cada una de las cuatro estaciones.

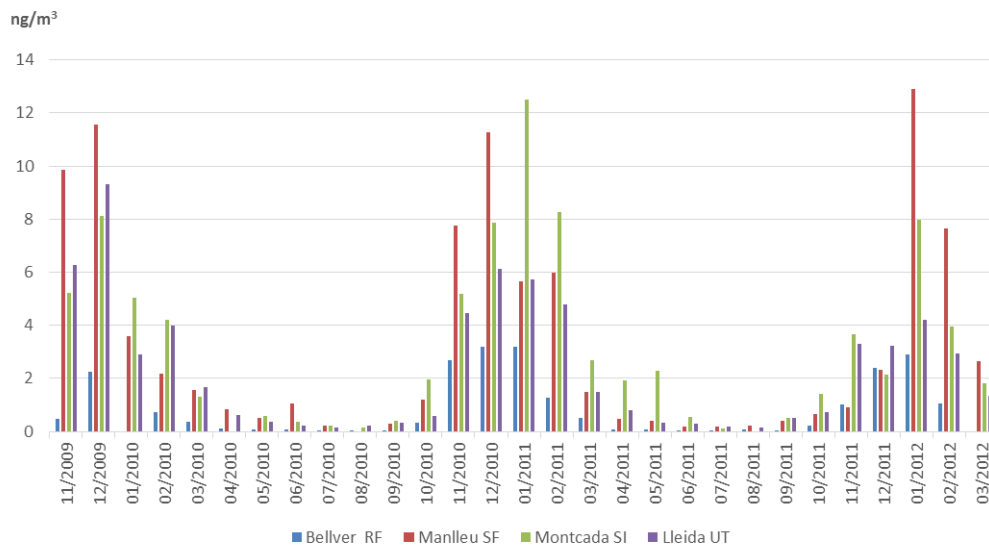


Figura 88. Evolución de la concentración de HAPs (suma de 7 HAPs: BaA, BbF, BkF, BjF, BaP, DiBaH a e IP) de cuatro estaciones: Bellver (RF: rural de fondo), Manlleu (SF: suburbana de fondo), Montcada (SI: suburbana industrial) y Lleida (UT: urbana de tráfico), de las muestras captadas entre noviembre 2009 y marzo 2012.

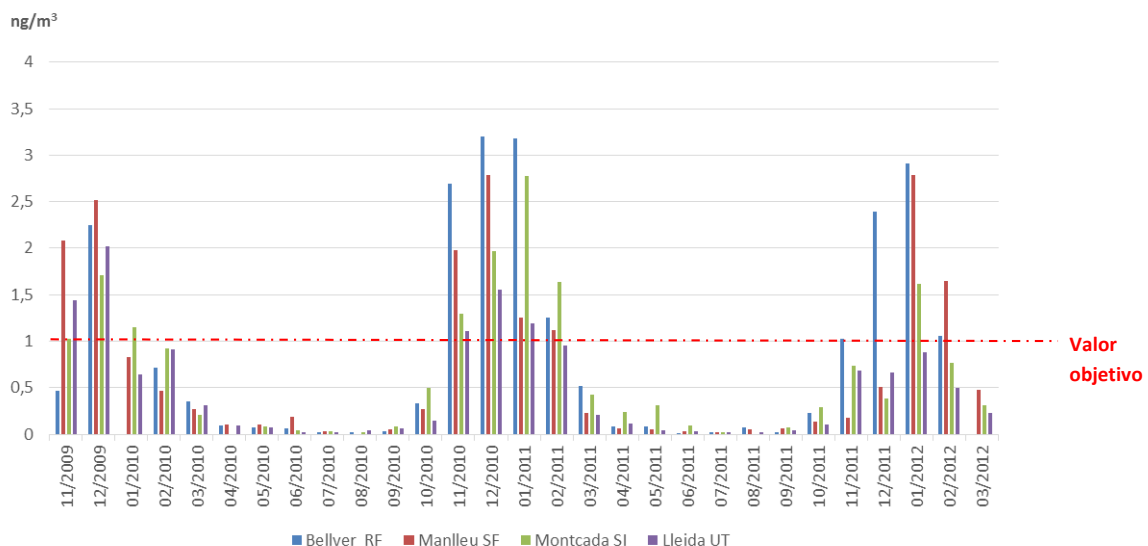


Figura 89. Evolución de la concentración de BaP de cuatro estaciones: Bellver (RF: rural de fondo), Manlleu (SF: suburbana de fondo), Montcada (SI: suburbana industrial) y Lleida (UT: urbana de tráfico), de las muestras captadas entre noviembre 2009 y marzo 2012. Se marca en línea roja el valor objetivo legislado para el BaP.

Como se puede observar en la [Figura 88] y la [Figura 89], la concentración tanto de HAPs como de BaP tiene una clara tendencia estacional. En los meses de verano, la concentración de HAPs puede disminuir hasta 10 veces la concentración de HAPs en invierno en el mismo municipio, obteniéndose máximos de concentración los meses de diciembre-enero y mínimos de concentración los meses de julio-agosto. Esta variación se puede deber a:

- A la mayor emisión de estos contaminantes por fuentes antropogénicas como calefacciones o combustión de madera u otros materiales, en los meses de invierno.
- Al fenómeno de inversión térmica²⁶ que se da, preferiblemente en los meses de más frío. Cuando existe condiciones de inversión térmica y se emiten contaminantes a la atmósfera, éstos se acumulan debido a que los fenómenos de transporte y difusión ocurren demasiado lentos por una paralización de la circulación atmosférica. Así, el aire en las capas bajas de la atmósfera no se renueva y la concentración de los contaminantes en esta zona aumenta.

Si se consideran los resultados obtenidos para cada una de las estaciones se puede decir:

- Los años 2009 y 2010, durante los meses de más frío (diciembre y enero), la concentración promedio de BaP en las cuatro estaciones consideradas supera el valor objetivo legislado (1 ng/m^3). Sin embargo, en el año 2012 se observa una disminución de este contaminante, especialmente, en las estaciones tanto suburbana industrial (Montcada) como urbana de tráfico (Lleida). Para poder atribuir esta disminución a un mayor control de estos contaminantes, se debería conocer la tendencia evolutiva a partir del año 2012.
- En los meses de más frío, donde la concentración de HAPs (y BaP) es mayor, las estaciones donde se detectan estos contaminantes en mayor cantidad corresponden a las dos estaciones de fondo: Bellver (rural) y Manlleu (suburbana). Mientras que en los meses de calor se suele equilibrar la concentración entre las diferentes estaciones. Esto se atribuye a las calefacciones domésticas que son utilizadas en estos municipios no urbanos. Se suele utilizar calefacciones que utilizan como combustible la madera o el gasoil, por lo que se tiene una mayor emisión de este tipo de contaminantes. En cambio, en las zonas urbanas suele predominar la calefacción doméstica eléctrica o con gas natural, de manera que la emisión de estos contaminantes es mucho menor.
- A medida que pasan los meses de invierno, la estación con mayor concentración de HAPs (y BaP) corresponde a Montcada, estación suburbana industrial siempre por encima de la urbana de tráfico. En realidad, este resultado era de esperar ya que, en realidad en las zonas industriales se suelen sumar ambas fuentes de emisión, la industrial como predominante pero también la de tráfico. Destacando también que los

²⁶ Una inversión térmica es una derivación del cambio normal de las propiedades de la atmósfera con el aumento de la altitud. Usualmente corresponde a un incremento de la temperatura con la altura, o bien a una capa de inversión donde ocurre el incremento. El aire, no puede elevarse en una zona de inversión, puesto que es más frío, y por lo tanto, menos denso en la zona inferior.

vehículos que se mueven en las zonas industriales suelen ser de mayor tonelaje y suelen utilizar combustibles que tienen un mayor aporte de emisión de este tipo de contaminantes que la flota de vehículos que predominan en las zonas urbanas.

7.2.3. Comparación de la concentración de los HAPs y del BaP en las diferentes estaciones.

Para comparar la concentración tanto de los HAPs como de BaP de las diferentes estaciones, se han considerado los resultados obtenidos en dos meses representativos: diciembre (invierno) y junio (verano) de los años 2009, 2010 y 2011. Se escoge el mes de junio en representación de los resultados de verano ya que de los meses de esta estación es en el que la concentración de estos contaminantes es más alta, y consecuentemente, en más casos cuantificable.

Así, de las muestras de diciembre y de junio de todas las estaciones, se calcula la concentración promedio de HAPs y BaP, por mes de captación. Además, en este caso, también se considera el valor máximo y el valor mínimo para tener más representatividad de resultados.

En las [Figura 90] y [Figura 91], se representan los resultados de los HAPs obtenidos en las muestras de las diferentes estaciones en el mes de diciembre y junio, respectivamente. Las estaciones se han ordenado según área de captación: RF-rural de fondo (Bellver y Berga); RT-rural de tráfico (Tortosa); SF-suburbana de fondo (Manlleu, La Bisbal y Tiana); SI-suburbana industrial (Montcada, Sant Celoni, Constantí e Igualada) y UT-urbana de tráfico (Lleida y Vilanova i la Geltrú).

En las [Figura 92] y [Figura 93], se representan los resultados de los BaP de las mismas muestras también en los dos meses representativos considerando el mismo orden de las estaciones.

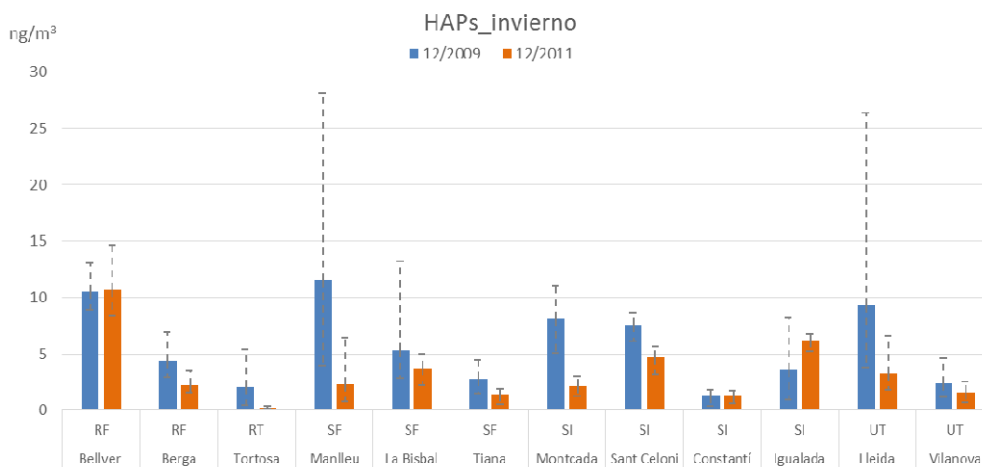


Figura 90. Concentración de HAPs (suma 7 HAPs: BaA, BbF, BkF, BjF, BaP, DiBaH A e IP) de todas las estaciones, de los meses de invierno diciembre de 2009 y diciembre de 2011.

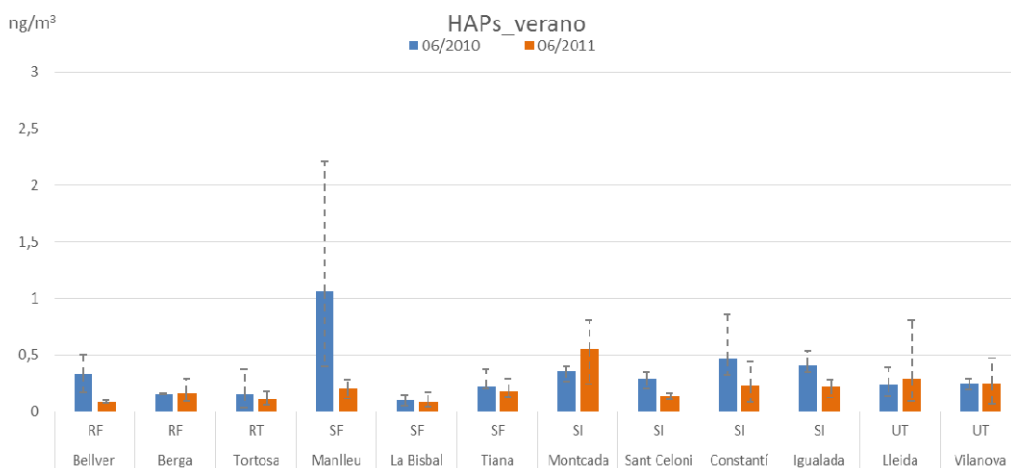


Figura 91. Concentración de HAPs (suma 7 HAPs: BaA, BbF, BkF, BjF, BaP, DiBaH A e IP) de todas las estaciones, de los meses de verano junio de 2010 y junio de 2011.

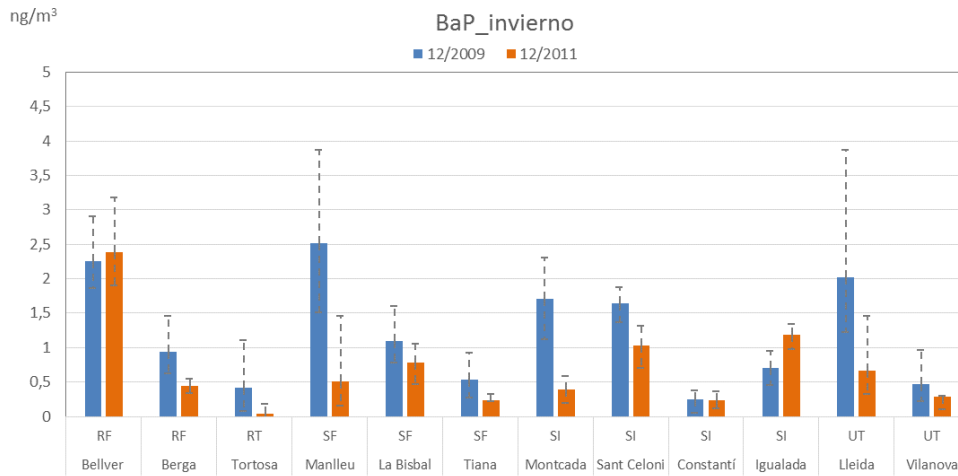


Figura 92. Concentración de BaP de todas las estaciones, de los meses de invierno diciembre de 2009 y diciembre de 2011.

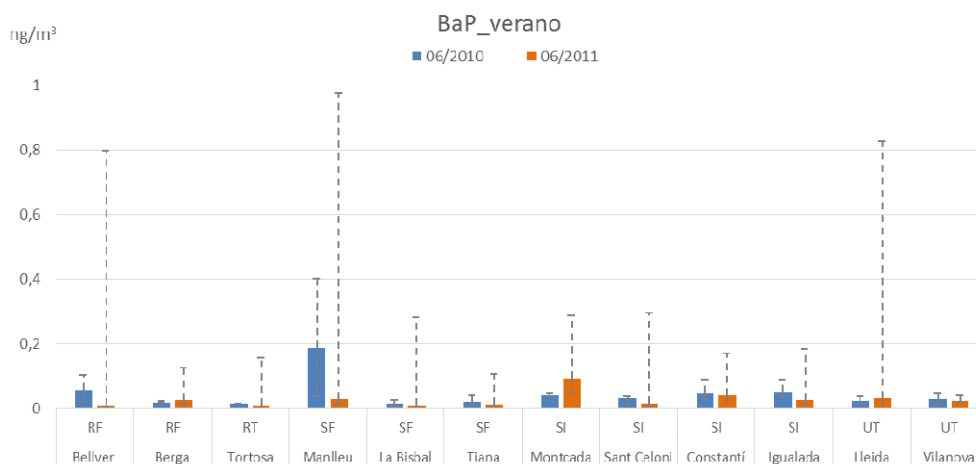


Figura 93. Concentración de BaP de todas las estaciones, de los meses de verano junio de 2010 y junio de 2011.

En todas las estaciones consideradas se observa el cambio estacional de las concentraciones tanto de HAPs como de BaP.

Además se puede observar que:

- Los perfiles obtenidos de HAPs y BaP son equivalentes en todas las estaciones, siendo la concentración del BaP aproximadamente de $\frac{1}{4}$ parte de la concentración global de HAPs.
- En invierno, prácticamente en todas las estaciones, se ha superado el valor objetivo para el BaP (1 ng/m^3), excepto en las estaciones de Tortosa (RT), Tiana (SF) y Constantí (SI). En cambio, en verano en ninguna de las estaciones se supera este valor límite.
- En todas las estaciones se observa una evolución descendiente de la concentración tanto de HAPs como de BaP, siendo siempre mayores en el año 2009 respecto al 2011, exceptuando únicamente la estación de Igualada, donde la concentración de HAPs aumenta ligeramente. Esta evolución es poco concluyente porque disponen de pocos resultados. Se deberían considerar los resultados de años posteriores (a partir del 2013 a la actualidad).
- En invierno, las estaciones que tienen una mayor concentración de HAPs (y de BaP) son Bellver (RF), Manlleu (SF), Lleida (UT), llegando en 2009 a concentraciones de hasta 28 ng/m^3 . En cambio, en el año 2010, Bellver sigue siendo la estación con mayor nivel de HAPs (aproximadamente 10 ng/m^3), seguida en este caso, por Igualada (8 ng/m^3). De manera, que en este segundo periodo, la concentración en Lleida y Manlleu, disminuye considerablemente.
- En Verano tanto del año 2010 como 2011, la concentración de los HAPs y de BaP, de todas las estaciones es muy parecida, siendo la más alta la concentración Manlleu (2010) con un nivel de HAPs de unos $2,3 \text{ ng/m}^3$ y Montcada (2011) con un máximo de $0,8 \text{ ng/m}^3$.
- No se puede decir que exista una relación entre la concentración de los HAPs y el área de captación, ni en invierno ni en verano. Aunque en verano, se observa una mayor homogeneidad de resultados entre todas las estaciones ya que los niveles son menores en todos los casos, y las diferencias no son tan claras. Por lo que no es posible relacionar el nivel de HAPs (o BaP) en el aire ambiente ni según el área de captación ni según la fuente emisora prioritaria de la zona.

7.2.4. Estudio de la proporción de cada uno de los HAPs en las muestras de las diferentes estaciones o áreas de captación.

Para el estudio de la proporción de cada una de los HAPs a estudio (BaA, BbF, BkF, BjF, BaP, DiBahA e IP) en las diferentes muestras analizadas, se han considerado los resultados de las muestras captadas los meses de diciembre (2009, 2010 y 2011) de las diferentes estaciones. Se descartan las muestras captadas los meses de verano, ya que como la concentración de los HAPs es mucho menor y, en ocasiones, inferior al límite de cuantificación, falsearía los resultados de las proporciones de los HAPs en las muestras.

Así, de cada una de las muestras de las diferentes estaciones, se ha calculado la relación entre la concentración de cada uno de los HAPs respecto a la suma total de HAPs, expresados en porcentaje. Los resultados de todas las muestras de una misma estación se han representado en diagramas circulares, que se presentan en las siguientes figuras: [Figura 94] con las estaciones Rurales de fondo (Bellver y Berga); [Figura 95] con las estaciones Suburbanas de fondo (Manlleu, La Bisbal y Tiana); [Figura 96] con las estaciones Suburbanas industriales (Constantí, Igualada, Montcada y Sant Celoni); [Figura 97] con las estaciones Urbanas de tráfico (Lleida, Tortosa y Vilanova i la Geltrú).



Figura 94. Porcentajes de cada uno de los 7 HAPs (BaA, BbF, BkF, BjF, BaP, DiBahA e IP) en las estaciones **rurales de fondo**: Bellver de la Cerdanya y Berga. Muestras de invierno de los años 2009, 2010 y 2011.



Figura 95. Porcentajes de cada uno de los 7 HAPs (BaA, BbF, BkF, BpA, DiBahA e IP) en las estaciones **suburbanas de fondo**: Manlleu, La Bisbal y Tiana. Muestras de invierno de los años 2009, 2010 y 2011.

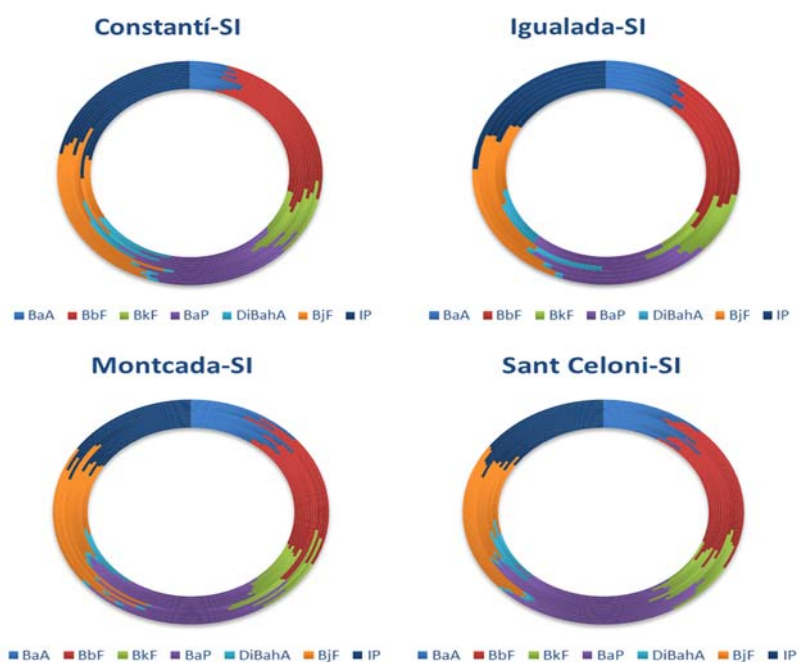


Figura 96. Porcentajes de cada uno de los 7 HAPs (BaA, BbF, BkF, BpA, DiBahA e IP) en las estaciones **suburbanas industriales**: Constantí, Igualada, Montcada y Sant Celoni. Muestras de invierno de los años 2009, 2010 y 2011.

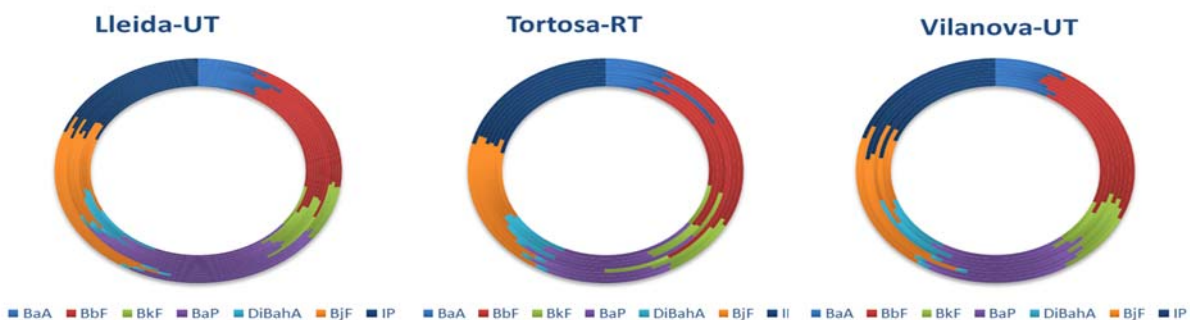


Figura 97. Porcentajes de cada uno de los 7 HAPs (BaA, BbF, BkF, BpA, DiBahA e IP) en las estaciones **urbanas de tráfico**: Lleida, Tortosa y Vilanova y la Geltrú. Muestras de invierno de los años 2009, 2010 y 2011.

Como se puede observar en los gráficos presentados de las muestras de las diferentes estaciones, el porcentaje individual de cada uno de los HAPs a estudio (BaA, BbF, BkF, BjF, BaP, DiBahA e IP) es equivalente en todas las muestras, independientemente del tipo de estación y no se observan diferencias entre zonas (rural, suburbana y urbana) ni entre fuente mayoritaria de emisión (fondo, industrial o tráfico). Las proporciones globales promedio de cada uno de los HAPs a estudio en muestras de aire ambiente se presentan en la [Figura 98].

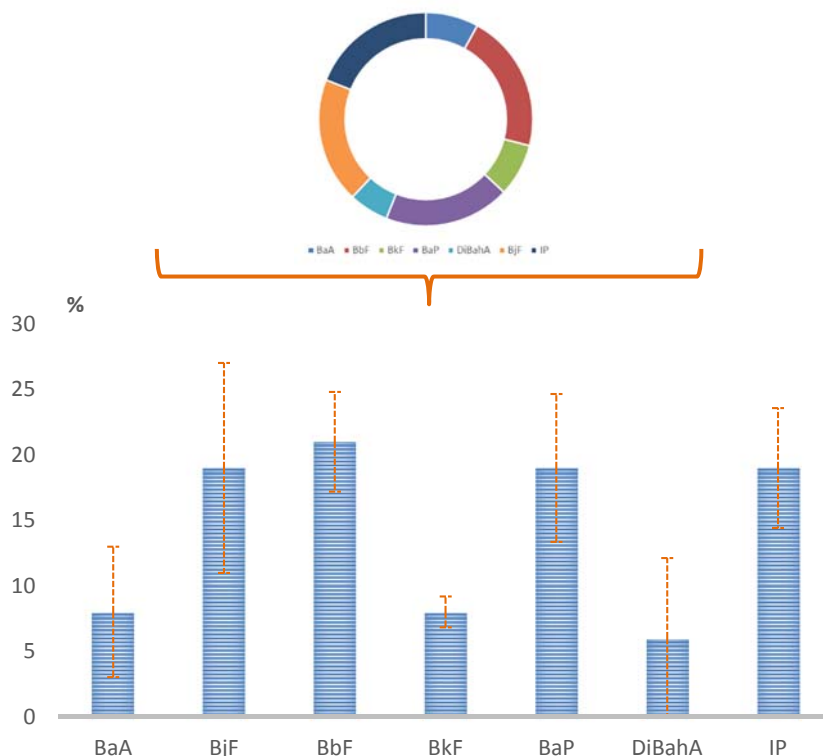


Figura 98. Porcentajes de cada uno de los 7 HAPs (BaA, BbF, BkF, BjF, BaP, DiBahA e IP) globales en todas las muestras de aire ambiente, independientemente del tipo de estación.

Los HAPs mayoritarios en todas las muestras de aire ambiente son BbF, BjF, BaP e IP, donde cada uno de ellos ocupa entre un 19 y un 21%. El 20% restante, se divide entre los otros tres compuestos. Éstos se encuentran en una proporción del 8% (BaA y BkF) y del 6% (DiBahA), respectivamente. De forma proporcional, la variabilidad mayor se tiene en el BaA y DiBahA, compuesto minoritarios.

Esta representación indica que en todas las muestras de aire ambiente analizadas, independientemente de su área de captación (zona o fuente emisora mayoritaria), la proporción individual de cada uno de los HAPs a estudio se mantiene. Esto indicaría que a pesar que existen fuentes emisoras mayoritarias cerca de cada una de las estaciones, la homogeneidad en el ambiente es notable, sin poder diferenciar fuentes emisoras específicas en cada una de las áreas.

***CAPITULO IV.
DETERMINACIÓN DE HAPs EN
MATRICES ALIMENTARIAS:
LECHE Y CAFÉ**

Tal y como se ha comentado en la introducción de la presente tesis, los HAPs son una familia de contaminantes a la que los humanos estamos expuestos tanto a través del aire que respiramos como a través de los alimentos que ingerimos.

La presencia de los HAPs en los alimentos que forman parte de nuestra dieta provienen, fundamentalmente, de la contaminación externa de la matriz, ya que los HAPs son contaminantes ubicuos presentes en todos los compartimentos atmosféricos. Aunque estos compuestos, también se pueden formar durante su procesado, tanto industrial como doméstico. Entre los principales procesos se destaca el secado, la fritura, rustido, entre otros.

Si se tienen en cuenta los alimentos que ingerimos, los cereales y derivados, pescados y mariscos ahumados y carnes a la parrilla, son las categorías de alimentos aparentemente más contaminadas con esta familia de compuestos. Sin embargo, otros alimentos pueden contener HAPs, aunque en menor concentración, como los aceites y grasas, tubérculos, legumbres, leche, cacao y café. (Ireland, 2009)

Así, en el campo alimentario, en la presente tesis, se ha trabajado en el desarrollo de procedimientos para la determinación de HAPs en dos tipos de matrices: **leches** y **café**. Los alimentos propuestos, se caracterizan por tener un elevado contenido lipídico, por lo que, el carácter lipófilo de los HAPs, los hace especialmente afines.

La leche, se ha escogido por ser una matriz líquida, que también cuenta con un importante contenido lipídico (del orden del 5%) y de procedencia animal. Por lo tanto, su contaminación será ambiental aunque, posiblemente, influirá la metabolización de estos contaminantes por parte del animal.

El café, también es una matriz que tiene un elevado contenido lipídico (cercano al 15%). En este caso, es una matriz sólida de procedencia vegetal, cuya contaminación por HAPs se valorará, principalmente debido a su procesado, ya que se disponen de muestras del mismo grano de café verde y tostado.

En lo que hace referencia a la legislación relacionada con los niveles de HAPs en las matrices alimentarias a estudio, el Reglamento nº 835/2011 no incluyen valores límite de HAPs ni para la leche ni para el café. Sin embargo, sí que se establecen niveles para el BaP y el grupo de HAP4 para aceites y grasas, por lo que si los resultados se expresan sobre materia grasa, pueden servir como referencia. Los niveles legislados de HAPs en aceites y grasas son de 2 µg/kg para el BaP y 10 µg/kg para los HAP4. Además, en el caso de la leche, se incluye una categoría que guarda una cierta similitud que corresponde a los “alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad”, entre la que se incluye la leche para lactantes o leches de continuidad. En este caso, los límites establecidos son de 1 µg/kg, tanto para el BaP como para los HAP4.

En el caso del café, aunque la UE tampoco especifica un nivel límite de HAPs ni en el grano ni en la bebida, el Comité Científico de los Alimentos (*Scientific Committee on Food, SCF*) pide a los estados miembros de la unión un análisis detallado de los HAPs en alimentos en los que es posible su presencia. Entre las categorías de alimentos especificadas por la SCF se incluye el café. A raíz de esta recomendación, algunos países de la UE han establecido un límite objetivo de HAPs en estas nuevas categorías de alimentos. Es importante destacar, que la República Checa establece el límite de HAP8 en café tostado en 2 µg/kg.

En lo que hace referencia a los HAPs en las matrices alimentarias, aunque se dispone de métodos cromatográficos tanto para la separación de los 16 HAPs de la EPA como de los 15 HAPs propuestos por la SCF, se decide centrar el estudio en la determinación tanto del grupo de los HAP4 como de los HAP8. Así, se considerarán los siguientes compuestos: BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP e IP.

Los principales problemas que se plantean, a priori, en el análisis de HAPs en los alimentos, son el bajo nivel de concentración en el que se encuentran estos contaminantes en las muestras, la elevada probabilidad de que existan interferencias de matriz, además, de la dificultad de extraer los compuestos de la matriz muestra considerando su elevado contenido lipídico.

Así, en la presente tesis se desarrollarán procedimientos para la determinación de los HAPs, tanto en muestras de leche cruda como de café en grano. En todos los casos, se presenta una pequeña introducción de la composición de la matriz a estudio, que ayudará a entender mejor el procedimiento propuesto para la extracción de los HAPs, además de las posibles formas de contaminación referentes a esta familia de compuestos. Además, se presentan los métodos hallados en bibliografía que pueden servir como punto de partida para la posterior optimización del procedimiento de preparación de muestras. En todos los casos, se propone un análisis cromatográfico de los HAPs que se basará en alguno de los métodos de separación incluidos en el Capítulo I de la presente tesis.

Los procedimientos de análisis propuestos en cada caso, serán validados o, en su defecto, se determinarán diferentes parámetros de calidad que permitirán asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos. Finalmente, se realizará el análisis de diferentes muestras reales, la descripción de las cuales se incluirá en cada uno de los apartados correspondientes.

- **Evaluación de la exposición humana según ingesta diaria de determinados alimentos. Niveles de HAPs en los alimentos a estudio.**

Para poder evaluar el impacto que provoca la contaminación humana por HAPs ligada a la ingesta de determinados alimentos, es necesario conocer tanto su consumo (g/día), como los niveles de concentración de HAPs que se han hallado en estudios previos.

En la [Tabla 136], se presenta las categorías de los alimentos según consumo, que la EFSA (*European Food Safety Authority*) propone para el estudio de los HAPs. Cada una de las categorías se les incluye un identificador. Se puede observar que en la tabla no se incluyen las categorías 05 (raíces y tubérculos de almidón), 07 (bebidas no-alcohólicas) y 12 (Especies), ya que son categorías donde es poco probable hallar este tipo de contaminantes.

Tabla 136. Categorías de alimentos asignadas en función del consumo que se tienen en cuenta para el estudio de la presencia de los HAPs, según la EFSA. (EFSA E. F., 2008)

| ID_ categoría | Categoría según consumo | Se destaca en la categoría... |
|---------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 01 | Cereales y productos de cereales | Cereales |
| 02 | Azúcar y productos con azúcar | Chocolate |
| 03 | Grasas vegetales y animales | Aceites y grasas. Se excluye la manteca de cacao y el aceite de orujo |
| 04 | Vegetales, nueces y legumbres | Vegetales y nueces |
| 06 | Frutas (4% fruta seca; 96% otra fruta) | Fruta seca |
| 08 | Café, té, cacao (expresado como bebida líquida) | Café |
| 09 | Bebidas alcohólicas | Bebidas alcohólicas |
| 10 | Carnes y productos cárnicos | Carnes |
| 11A | Mariscos | Moluscos |
| 11B | Pescados (30% elaborado; 70% fresco y congelado) | Pescado procesado |
| 13 | Leche y productos basados en lácteos | Quesos ahumados |

Como se puede observar en la [Tabla 136], el café se incluye en la categoría número 08 y la leche en la 13. Así, queda claro, que las dos categorías de alimentos escogidas para estudio en la presente tesis, también han consideradas de estudio prioritario por la EFSA en lo que hace referencia a los HAPs.

En la [Figura 99], se representa el consumo medio por día (g/día, considerando la población total) de los alimentos correspondientes a las categorías incluidas en la [Tabla 136]. Como se puede observar, la categoría correspondientes al café, té y cacao es la de mayor consumo con un 34%, seguida de los cereales y las bebidas alcohólicas. Cabe destacar, que el grupo de los lácteos representan un 2% de la cantidad total.

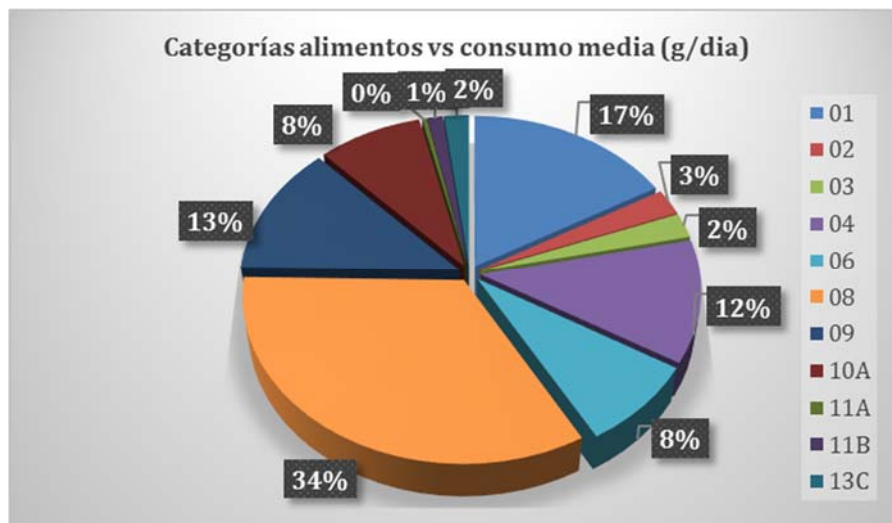


Figura 99. Consumo medio (g/día) en la población total de los alimentos que constituyen las categorías representadas en la [Tabla 136]. Se ha considerado el consumo de la población de 16 países europeos (Bélgica, Bulgaria, República Checa, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Islandia, Irlanda, Italia, Holanda, Noruego, Eslovaquia, Suecia y Gran Bretaña). (EFSA E. F., 2008)

Gracias a la Recomendación de la Comisión (2005/108/EC) donde se aconseja a los Estados miembros de la Unión que se realicen estudios de investigación de los niveles de HAPs en las categorías de alimentos incluidas en la [Tabla 136], en este momento, es posible disponer de datos de niveles de BaP y de otros HAPs (HAP4 o HAP8), recogidos en el informe de la EFSA publicado el 29 de Junio de 2007 "Findings of the EFSA Data Collection on PAHs in Food". (EFSA, 2007)

En la [Figura 100], se incluye el número de muestras analizadas en cada una de las categorías en las que se han clasificados los alimentos. (EFSA, 2007)

Como se puede observar, las categorías más estudiadas y de las que se han obtenido más resultados son los pescados y mariscos, seguidas de los productos cárnicos y de los aceites y las grasas. Mientras que el café y la leche (o los productos lácteos) corresponde al grupo de las que se han analizado menor número de muestras.

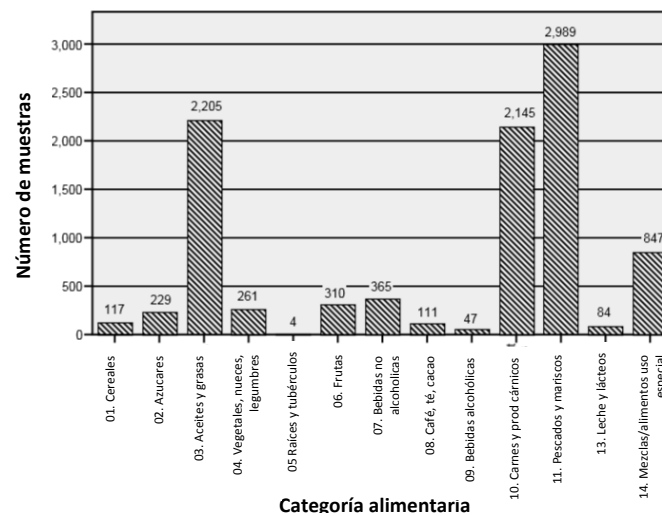


Figura 100. Número de resultados reportados de HAPs en las principales categorías de alimentos estudiados. (EFSA, 2007)

En lo que hace referencia a los resultados obtenidos, se plantea el problema de que a pesar de que se analizan muchas muestras, los límites de cuantificación que se tienen en los diferentes laboratorios son dispares. Además, como los niveles de dichos contaminantes en los alimentos son muy bajos, provoca que muchos laboratorios tengan resultados no cuantificables, en consecuencia, no reportables.

En la [Figura 101], se presenta la concentración de HAP8 en 33 subcategorías de alimentos considerando los resultados de más de 4065 muestras, que dan una idea del nivel de HAPs que cabe esperar en las muestras a estudio.

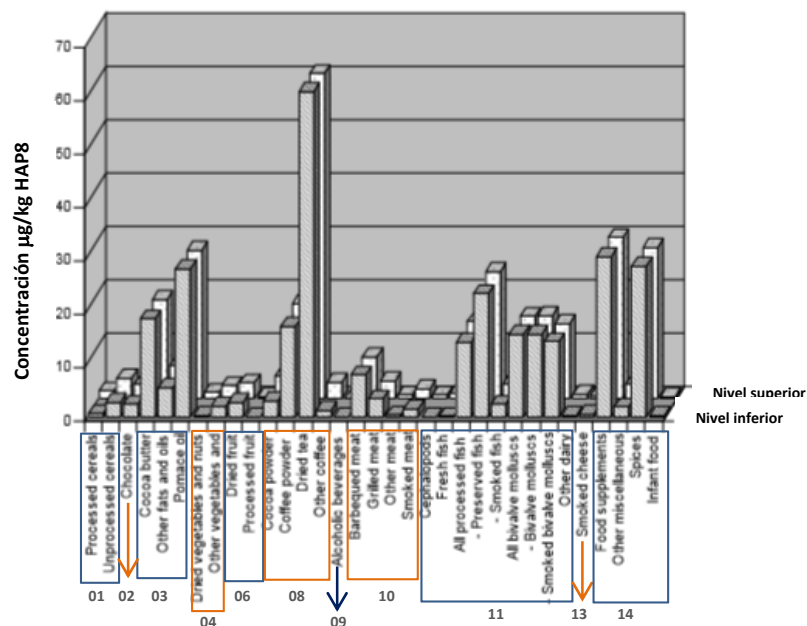


Figura 101. Valores límite (superiores e inferiores) para la concentración de HAP8 expresado en $\mu\text{g}/\text{kg}$, halladas en diferentes tipos de alimentos. Para cada uno de los subgrupos alimentarios, se marca la categoría [Tabla 136] a la que pertenecen. (EFSA E. F., 2008)

Como se puede observar en la [Figura 101], descartando la subcategoría correspondiente al té seco donde el nivel de HAPs puede llegar hasta los 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$, el aceite de orujo y la manteca de cacao (dentro de la categoría de los aceites y las grasas), el café en polvo y diversos pescados y moluscos pueden tener niveles de HAP8 superiores a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Sin embargo, en los aceites vegetales y en los productos lácteos los niveles serían inferiores: del orden de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en aceites vegetales e inferiores a 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en los productos lácteos.

Queda claro que los niveles de HAPs en las matrices alimentarias serán muy bajos, del orden de los $\mu\text{g}/\text{kg}$ o incluso inferiores. Estos niveles son interesantes ya que marcaran los límites de cuantificación de los procedimientos a poner a punto, ya que deberían ser entre 10 y 100 veces inferiores a los niveles legislados (si es que existe límite) o, en su defecto, a los niveles reportados.

1. DETERMINACIÓN DE HAPs EN MUESTRAS DE LECHE.

1.1. LA LECHE COMO MATRIZ DE ESTUDIO.

La leche, desde los inicios de los tiempos, ha sido uno de los productos más ampliamente consumido por la humanidad como alimento, y actualmente, aún es, por excelencia el principal alimento de los recién nacidos, ya que contiene una gran cantidad de nutrientes esenciales para la vida.

En lo que hace referencia a sus propiedades organolépticas, la leche es un líquido opaco. En la [Tabla 137] se presentan alguna de sus propiedades físico-químicas.

Tabla 137. Propiedades físico-químicas de la leche. (Frazier, 2009)

| Propiedades Físico-químicas | |
|--------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Densidad (15°C) [kg/L] | 1,029-1,039 |
| pH (leche fresca) | 6,50-6,75 |
| Índice de refracción (n_d^{20}) | 1,341-1,348 |
| Conductividad específica (25°C) [$\text{ohm}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$] | $4-5 \times 10^{-3}$ |
| Punto de congelación [°C] | Entre -0,53 y -0,55 |

La leche, mayoritariamente, está compuesta por agua (> 50%). Entre los otros componentes que forman parte de su suero, se puede destacar la grasa, las proteínas y los carbohidratos. Aunque también existen, en menor concentración, minerales y otros nutrientes. Es importante tener en cuenta, que la composición de la leche varía significativamente en función de su origen biológico. En el presente trabajo, se ha trabajado únicamente con leches de vaca y de oveja.

La **grasa**, que supone una proporción entre el 1,9% (leche de caballo) y un 18,0% (leche de reno), se presenta en forma de pequeñas gotas creando una emulsión. En la leche de vaca se encuentra al 3,9% mientras que en la de oveja del 7,2%. Está formada, principalmente por triglicéridos de ácidos grasos de cadena corta, principalmente ácidos butíricos saturados (95-96%). Aunque también se encuentran otros ácidos saturados de hasta 18 átomos de carbono (65%), ácidos mono-insaturados (16:1 y 18:1, en un 30%) y poliinsaturados (18:2 y 18:3 en un 5%).

En cuanto a los **carbohidratos**, el principal es la lactosa (en la forma alfa monohidratada) con una proporción en la leche de entre el 3% y el 7%. Otros azúcares presentes en la leche, aunque en menor proporción, son la glucosa, los amino azúcares y los oligosacáridos.

Las **proteínas** que corresponden, aproximadamente, a una proporción promedio del 3,5 %, se encuentran mayoritariamente representadas por la caseína que supone, en muchos casos, hasta el 85% de la proteína total de la leche. La caseína se encuentra, mayoritariamente, dispersa en forma de un conjunto de micelas estabilizadas tanto por interacciones hidrofóbicas como por fosfato de calcio o caseína- K²⁷, sólo un 10% de esta caseína se encuentra solubilizada en forma de monómeros. Otras proteínas minoritarias que se pueden encontrar en la leche son la lactoalbúmina y la lactoglobulina. (P. L and F. HM, 1982); (M- DJ and B. RJ, 1984)

La leche también contiene **minerales** (K: 1500 mg/L; Ca: 1200 mg/L; Na: 500 mg/L; Mg: 120 mg/L) y **vitaminas**, con la vitamina C como mayoritaria (20 mg/L).

Actualmente, sólo una pequeña proporción de la leche que se produce se comercializa como leche cruda. Es importante destacar, que tanto la legislación americana (FDA, PMO Rev. 2009) como la española (Real Decreto nº 640/2006) prohíben su comercialización. (FDA, 2009); (Real Decreto 640/2006, s.f.)

No existe un método estrictamente definido a la hora de tratar la leche cruda. El proceso y el orden de las etapas pueden variar en función tanto del fabricante como del tipo de leche que se quiera obtener. A pesar de ello, en todos los casos, se aplica un tratamiento térmico (calentamiento a una determinada temperatura y posterior enfriamiento rápido) con el objetivo de eliminar los microorganismos patógenos y disminuir el número de agentes microbianos que puedan afectar a su calidad. Las temperaturas de calentamiento oscilan entre los 75°C (pasteurización) o 138 °C (Ultra pasteurización o UHT (*Ultra-High Temperature*)), por lo que parece poco probable la formación de HAPs durante el tratamiento térmico.

²⁷ La caseína-K es una de las fracciones de la caseína que se caracteriza por mantenerse soluble en agua en presencia de iones de calcio (Ca²⁺) a la concentración en que este ion se encuentra en la leche. Gracias a esta propiedad, es posible la formación de complejos con la caseína de la leche y la formación de micelas estables que evitan fenómenos de coagulación. (Frazier, 2009)

1.1.1. Fuentes de contaminación de HAPs en la leche.

Los HAPs son compuestos que debido a su carácter lipófilo y su baja solubilidad en agua se encuentran junto a la fracción grasa de la leche. Debido al tratamiento que se da para la comercialización de la leche cruda, parece poco probable que estos compuestos se formen en el procesado, ya que las etapas de calentamiento que se llevan a cabo, no llegan a temperaturas suficientemente elevadas como para favorecer su formación.

Para poder entender cómo se contamina la leche por HAPs, descartando la etapa de procesado, es lógico pensar que el responsable es la contaminación ambiental. Los HAPs, como se ha comentado, son contaminantes ubicuos presentes en todos los compartimentos ambientales. Así, pueden incorporarse a los animales que contaminarán la leche que producen, a través tanto del aire que respiran, como el agua que beben, como de los alimentos que ingieren. Es importante destacar que es posible que los HAPs adheridos a las partículas del aire ambiente, se depositen sobre los alimentos que ingieren estos animales.

Estudios indican que las vacas, animales que producen la mayor cantidad de la leche que ingerimos, llegan a ingerir entre 65 y 100 veces más HAPs que los humanos, hecho que lleva a pensar, en un potencial riesgo de contaminación de la leche que producen. Sin embargo, su baja esperanza de vida comparada con la de los humanos hace que ésta sea poco significativa.

La bioacumulación de estos contaminantes en el tejido adiposo de los organismos es un fenómeno conocido, así como también es conocida la acumulación de estos contaminantes en la leche materna. Es importante destacar, que aunque se han encontrado diferencias significativas de concentración de HAPs entre pastos de zonas rurales y pastos urbanos, no se han encontrado diferencias significativas en el contenido de estos contaminantes en muestras de leche relativas a las respectivas zonas. Esto puede ser debido a la metabolización parcial de estos contaminantes por parte del animal. (A.S. Group, R.Assessment and C. Management, 2006); (C. Crépineau, 2003); (N. Grova, 2000)

1.1.2. Procedimientos de análisis para la determinación de los HAPs en la leche. Antecedentes bibliográficos.

Actualmente, la determinación de HAPs en leche es aún un tipo de análisis del que la disponibilidad bibliográfica es escasa y, en algunos casos, poco accesible. Las publicaciones más recientes datan del 2005 pero acostumbran a ser poco concluyentes. De hecho, es importante destacar que aunque existen estudios de HAPs en este tipo de matrices, no existen valores límites legislados para este tipo de contaminantes en la matriz a estudio. (R. Ce, N. Del, P. Europeo, and Y. D. E. L. Consejo, "Commission regulation (EU) No 1881/2006, 2007)

De los artículos disponibles, los que citan obtener mejores resultados en términos de sensibilidad (niveles inferiores a 1 µg/kg en muestra) constan de una preparación de muestra basada en una primera etapa de disolución de la grasa o una saponificación. En algunos casos, esta etapa va seguida de dos o tres etapas de extracción con un disolvente orgánico como hexano, ciclohexano, tolueno, acetona o diclorometano. Después de la extracción, la fase orgánica puede ser purificada con cartuchos de extracción en fase sólida de sílice.

En cuanto a las técnicas analíticas utilizadas para determinar los HAPs en leche, las más comunes son la cromatografía líquida con detector de fluorescencia y la cromatografía de gases acoplada a un detector espectrómetro de masas. Así, teniendo en cuenta estas consideraciones, en este caso, se propone trabajar con algunos de los métodos cromatográficos puestos a punto en el Capítulo I de la presente tesis, en especial, se trabajará con el método de separación optimizado por UHPLC con detector de fluorescencia.

1.2. DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE HAPs EN MUESTRAS DE LECHE.

Se procede al desarrollo de un procedimiento para la determinación de HAPs en muestras de leche. El procedimiento de preparación de la muestra se ha llevado a cabo con una muestra de leche comercial pasteurizada fresca (contenido de grasa entre el 3,5 – 4 % p/p).

El objetivo es determinar los HAP8 (BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP e IP) en leche a una concentración entre 10 y 100 veces inferior al nivel legislado de BaP en leches de continuidad (1 µg/kg), es decir, se quiere llegar a unos límites de cuantificación de HAPs de entre 0,01 y 0,1 µg/kg.

En lo que hace referencia a la preparación de la muestra, después de la búsqueda bibliográfica realizada, se propone como primera opción, realizar una saponificación con la finalidad de saponificar las grasas y facilitar, posteriormente, la extracción de los contaminantes a estudio con un disolvente orgánico. Así, a partir de este procedimiento base, se plantea un diseño de experiencias para buscar las mejores condiciones, tanto de saponificación como de extracción.

1.2.1. Desarrollo del diseño de experiencias.

Para realizar el diseño de experiencias, se debe definir inicialmente el método de partida sobre el que se fijarán las diferentes variaciones. Los márgenes de variación fijaran el alcance del campo exploratorio.

El procedimiento propuesto consta de varias etapas que se describen a continuación:

- *1ª Etapa: Reacción de saponificación.* En un erlenmeyer esmerilado, se pesa una determinada cantidad de leche (inicialmente, 2,5 mL) y se adiciona potasa metanólica suficiente. Esta mezcla se introduce en un horno a temperatura donde se mantiene durante un periodo fijado de tiempo.
 - *2ª Etapa: Extracción Líquido-líquido.* Sobre la mezcla a temperatura ambiente, se adicionan 7,5 mL de agua para aumentar el volumen de fracción acuosa y facilitar la extracción líquido-líquido con el disolvente orgánico. Se adicionan 10 mL de disolvente de extracción. Se realiza la extracción líquido-líquido, de manera, que los HAPs una vez solubilizada la grasa, estarán en la fracción orgánica, que se separa y se introduce en un vial de 30 mL de un solo uso, tipo tubo *clic*. El proceso de extracción L-L se repite varias veces para conseguir extraer totalmente los HAPs.
 - *3ª Etapa: Secado del extracto orgánico.* En el vial de 30 mL de tubo *clic*, donde se tiene el extracto orgánico obtenido, se adiciona sulfato de sodio anhidro hasta conseguir floculación, aspecto que indica que el extracto orgánico está seco.
 - *4ª Etapa: Filtración del extracto orgánico.* Una vez seco el extracto orgánico, se pasa a través de un filtro de papel para separar el sulfato de sodio que ha captado la humedad existente en el extracto orgánico y obtener así, el extracto orgánico seco en un tubo de vidrio cónico.
 - *5ª Etapa: Concentración y reconstitución.* El extracto orgánico seco se concentra a sequedad bajo corriente de nitrógeno en un baño de agua a unos 50°C y finalmente, se reconstituye con 1 mL de acetonitrilo.
- Este extracto es el que se inyecta directamente en el cromatógrafo.*

De las etapas del procedimiento de preparación de muestra, se consideran críticas la primera y la segunda etapa, por lo que las variables o factores del diseño de experiencias pertenecerán a estas dos etapas. En la [Tabla 138], se presentan nuevamente las etapas del procedimiento y se indican las variables o factores que se consideraran en el diseño de experiencias.

Tabla 138. Etapas del procedimiento de preparación de muestra. Se indican las condiciones fijas y las variables o factores que se considerarán en el diseño de experiencias..

| | ETAPA | Condiciones fijas | Variables o factores |
|----|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1º | Reacción de saponificación | 2,5 mL leche | Volumen de potasa metanólica (V) Temperatura de saponificación (T) Tiempo de saponificación (t) |
| 2º | Extracción líquido-líquido | 7,5 mL de agua MilliQ. 10 mL de disolvente de extracción | Disolvente de extracción (D) Número de extracción (N) |
| 3º | Secado del extracto orgánico | Adición de Na ₂ SO ₄ suficiente hasta floculación | --- |
| 4º | Filtración del extracto | Pasar a través de papel de filtro | --- |
| 5º | Concentración y reconstitución | Con corriente de N ₂ Reconstituir a 1 mL ACN | --- |

En la [Tabla 139], se presentan las variables o factores considerados en el diseño de experiencias y el número de niveles escogidos en cada uno de los casos.

Tabla 139. Definición de los niveles de estudio de cada uno de los factores del diseño de experiencias.

| NIVEL | FACTOR A | FACTOR B | FACTOR C | FACTOR D | FACTOR E |
|-------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------|------------------------|----------------------------|
| | Disolvente | Tiempo saponificación [h] | Temperatura saponificación [°C] | Número de extracciones | Volumen de KOH (MeOH) [mL] |
| 1 | Hexano | 0,5 | 80 | 1 | 1 x (Volumen M) |
| 2 | Ciclohexano | 2 | 50 | 3 | 3 x (Volumen M) |
| 3 | Acetona/ diclorometano | -- | --- | --- | --- |

M: muestra

Los niveles correspondientes al *Factor A* (disolvente de extracción) se han escogido teniendo en cuenta los disolventes más utilizados en bibliografía para realizar la extracción de los HAPs (hexano, ciclohexano y una mezcla acetona/diclorometano). Como en el caso del *Factor A*, los niveles correspondientes al *Factor B* (tiempo de saponificación) se han escogido, también teniendo en cuenta los tiempos publicados en bibliografía. Los niveles correspondientes al *Factor C* (temperatura de saponificación) corresponden a dos niveles extremos: la temperatura de 80°C es la máxima a la que se puede dar la saponificación sin tener problemas de sobrepresión en los recipientes. Por otro lado, temperaturas inferiores a 50°C, provocan que la saponificación sea demasiado lenta. Los niveles correspondientes a los *Factores D* y *F* (número de extracciones en la extracción líquido-líquido y el volumen de potasa metanólica, respectivamente), se han considerado, también, considerando la bibliografía disponible.

Si se tienen en cuenta el número de factores (5) y los niveles fijados (2 niveles para cuatro de los factores y 3 niveles para uno de ellos), se obtiene que para explorar todo el campo de estudio, suponiendo un diseño de experiencias de tipo factorial completo, se necesitan un total de 48 experiencias ($2^4 \times 3^1 = 48$). Con el objetivo de minimizar el número de experiencias, manteniendo al máximo posible la representatividad del sistema, se recorre a los diseños de experiencias definidos por *Taguchi*²⁸.

En este caso, también se plantea la posibilidad de estudiar las interacciones que, *a priori*, podrían resultar de interés. Así, se consideran interacciones de los factores AxB (disolvente de extracción x tiempo de reacción), AxC (disolvente de extracción x temperatura de saponificación) y BxC (tiempo x temperatura de saponificación).

Teniendo en cuenta el número de factores totales y los niveles de cada uno de ellos, se calculan los grados de libertad del sistema. En la [Tabla 140], se presenta el cálculo de los grados de libertad del sistema, considerando también las interacciones citadas.

²⁸ *Diseños de Taguchi*: la metodología del japonés *Taguchi* consiste en la optimización de productos y procesos. Para realizarlo, se basa en el diseño de experiencias utilizando herramientas estadísticas como los modelos ortogonales y las gráficas lineales, con el objetivo de obtener la máxima información con el mínimo número de experiencias posibles.

Tabla 140. Cálculo de los grados de libertad (GdL) del sistema a estudio.

| | Cantidad | GdL |
|------------------------------------------------------|----------|-----------|
| Factores a 2 niveles | 4 | 4 |
| Factores a 3 niveles | 1 | 2 |
| Interacciones entre factores de 2 niveles | 1 | 1 |
| Interacciones entre factores de 2 y 3 niveles | 2 | 4 |
| SUMA GdL | | 11 |

Como se observa en la [Tabla 140], el sistema propuesto consta de un total de 11 grados de libertad. Así, teniendo en cuenta estas dimensiones, se procede a determinar la matriz de *Taguchi* que sería la más adecuada para desarrollar el sistema de interés. La matriz ha de cubrir el número de grados de libertad del sistema (11) y, además, sería de interés disponer de algún grado de libertad más, para poder modificar la matriz para introducir dentro del sistema el factor de diferente nivel (como es el caso del *Factor A*) y poder realizar cálculo de errores (se requiere un grado de libertad adicional).

En este caso, teniendo en cuenta que todos los factores tienen 2 niveles excepto el *Factor A* que tiene 3, se propone trabajar con una matriz pensada para factores de dos niveles y utilizar la técnica de la “columna desocupada” para introducir el factor de 3 niveles. Para llevar a cabo esta técnica, se requiere de un grado de libertad adicional.

Así, teniendo en cuenta estos requisitos, se llega a la conclusión que una matriz de tipo $L_{16} (2^{15})$, que dispone de 14 grados de libertad y supone un total de 16 experiencias, sería la opción más adecuada.

| nº exp. | factores | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 3 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 4 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 5 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| 6 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| 7 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| 8 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| 9 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| 10 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| 11 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| 12 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| 13 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 |
| 14 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| 15 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| 16 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 |

Figura 102. Matriz de Taguchi $L_{16} (2^{15})$.

Como la matriz presentada en la [Figura 102], es una matriz pensada para factores de dos niveles, es necesario realizar alguna modificación para poder introducir el *factor A* de 3 niveles. En la [Figura 103], se incluye como se ha realizado la asignación de los factores a las columnas de la matriz.

| $L_{16} (2^{15})$ | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|----|----|----|-----|----|----|----|-----|----|----|-----|----|----|----|
| ds | A | | B | AxB | | | C | AxC | | | BxC | D | E | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| (1) | 3 | 2 | 5 | 4 | 7 | 6 | 9 | 8 | 11 | 10 | 13 | 12 | 15 | 14 |
| (2) | 1 | 6 | 7 | 4 | 5 | 10 | 11 | 8 | 9 | 14 | 15 | 12 | 13 | |
| (3) | 7 | 6 | 5 | 4 | 11 | 10 | 9 | 8 | 15 | 14 | 13 | 12 | | |
| (4) | 1 | 2 | 3 | 12 | 13 | 14 | 15 | 8 | 9 | 10 | 11 | | | |
| (5) | 3 | 2 | 13 | 12 | 15 | 14 | 9 | 8 | 11 | 10 | | | | |
| (6) | 1 | 14 | 15 | 12 | 13 | 10 | 11 | 8 | 9 | | | | | |
| (7) | 15 | 14 | 13 | 12 | 11 | 10 | 9 | 8 | | | | | | |
| (8) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | | | | | | |
| (9) | 3 | 2 | 5 | 4 | 7 | 6 | | | | | | | | |
| (10) | 1 | 6 | 7 | 4 | 5 | | | | | | | | | |
| (11) | 7 | 6 | 5 | 4 | | | | | | | | | | |
| (12) | 1 | 2 | 3 | | | | | | | | | | | |
| (13) | 3 | 2 | | | | | | | | | | | | |
| (14) | 1 | | | | | | | | | | | | | |

Figura 103. Asignación de los factores del diseño a las columnas de la matriz.
(ds: columna desocupada; Factores individuales: A, B, C, D y E; Interacciones entre factores: AxB, AxC y BxC)

Descripción de la asignación de los factores de la matriz L_{16} [Figura 103]:

- **Introducción del factor A** (3 niveles) a la matriz (técnica de la columna desocupada, ds). Se asigna la **primera columna como la columna desocupada** o inactiva. Después, se buscan dos columnas, en la interacción de las cuales se encontraría la columna desocupada. Estas columnas sería la segunda y la tercera. Por lo tanto, se asignan las **columnas 2 y 3** al factor A y se procede a la substitución de niveles para pasar de 2 columnas a 2 niveles a 1 columna de 3 niveles.
- La asignación de los otros factores se realiza considerando que ni los factores individuales ni las interacciones se solapan. Para ello, es necesario que cada factor tenga columnas diferentes asignadas y que las interacciones de interés, no queden confundidas, ni entre ellas, ni con los diferentes factores.

Interacciones:

- Las interacciones de AxB y AxC ocuparan tres columnas cada una, ya que suponen dos grados de libertad ($2 \text{ GdL} \times 1 \text{ GdL} = 2 \text{ GdL}$). Así, se asignan las columnas **5-6-7 para la interacción AxB** y las columnas **9-10-11 para la interacción AxC**.
- La interacción **BxC** sólo ocupará una columna ($1 \text{ GdL} \times 1 \text{ GdL} = 1 \text{ GdL}$) y se posiciona en la columna **12**.

Factores individuales:

Los factores individuales (exceptuando el factor A) se posicionarán en las otras columnas que quedan libres: **factor B** en la columna **4**, **factor C** en la columna **8** y los **factores D y E** en las columnas **13 y 14**, respectivamente.

- La columna **16**, que queda libre, es la asignada al **error experimental**.

Así, en la [Tabla 141], se presenta la matriz experimental:

Tabla 141. Matriz experimental que se aplicará en el diseño de experiencias.

| Experiencia | Disolvente de extracción L-L | Tiempo de saponificación [h] | Temperatura de saponificación [°C] | Número de extracciones L-L | Volumen de KOH (*) |
|-------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------------|----------------------------|--------------------|
| 1 | Hexano | 0,5 | 80 | 1 | 1M |
| 2 | Hexano | 0,5 | 50 | 3 | 3M |
| 3 | Hexano | 2 | 80 | 3 | 3M |
| 4 | Hexano | 2 | 50 | 1 | 1M |
| 5 | Ciclohexano | 0,5 | 80 | 1 | 3M |
| 6 | Ciclohexano | 0,5 | 50 | 3 | 1M |
| 7 | Ciclohexano | 2 | 80 | 3 | 1M |
| 8 | Ciclohexano | 2 | 50 | 1 | 3M |
| 9 | Ciclohexano | 0,5 | 80 | 3 | 1M |
| 10 | Ciclohexano | 0,5 | 50 | 1 | 3M |
| 11 | Ciclohexano | 2 | 80 | 1 | 3M |
| 12 | Ciclohexano | 2 | 50 | 3 | 1M |
| 13 | DCM/Acetona(1:1) | 0,5 | 80 | 3 | 3M |
| 14 | DCM/Acetona(1:1) | 0,5 | 50 | 1 | 1M |
| 15 | DCM/Acetona(1:1) | 2 | 80 | 1 | 1M |
| 16 | DCM/Acetona(1:1) | 2 | 50 | 3 | 3M |

(*) El volumen de KOH se expresa en función de los volúmenes de muestra (M).
DCM: diclorometano

Es importante tener en cuenta, que con la transformación realizada sobre la matriz L_{16} (2^{15}), la pérdida de ortogonalidad calculada, es del 10%, que supone una desviación aceptable en cuanto a la representatividad del sistema.

1.2.2. Disoluciones utilizadas para el diseño de experiencias.

Como criterio de evaluación del diseño de experiencias se decide evaluar la recuperación de muestras adicionadas. Para ello, sobre 2,5 mL de muestra de leche fresca comercial, se adicionan 50 μ L de un patrón conjunto con los 16 EPA-HAPs de una concentración de 1000 ng/mL diluido en acetonitrilo, y preparado por dilución a partir del patrón PAH MIX 9 (página 43).

Con las muestras adicionadas, se procede a realizar el proceso de preparación propuesto en cada una de las 16 condiciones de trabajo del diseño de experiencias. Una vez obtenidos los extractos, éstos se concentran a sequedad y se reconstituyen a 1 mL con acetonitrilo para ser analizados, posteriormente, por UHPLC-FLU en las condiciones cromatográficas indicadas en la [Tabla 64]. Así, la concentración adicionada en todas las muestras es de 20 μ g/kg de leche (equivalente a 50 ng/mL en el extracto inyectado).

Los cálculos se realizan frente a un patrón control de 50 ng/mL, preparado por dilución a partir de un patrón madre de 1000 ng/mL de los 16 EPA-HAPs, utilizado para realizar las adiciones. Así, se toman 50 µL del patrón conjunto de los 16 EPA-HAPs adicionados de 1000 ng/mL más 1 mL de acetonitrilo.

Paralelamente a las muestras adicionadas, para controlar posibles fuentes de contaminación y el nivel de fondo de HAPs que aporta la muestra, en cada una de las condiciones propuestas en el diseño de experiencias se realiza tanto un blanco de proceso como una muestra sin adicionar. En el caso del blanco de proceso, simplemente, se sustituyen los 2,5 mL de leche por la misma cantidad de agua MilliQ, a la que también se le aplica el mismo procedimiento de preparación correspondiente a cada una de las experiencias. En el caso de la muestra sin adicionar, la preparación es equivalente a la de la muestra adicionada pero sin incluir el volumen del patrón de adición.

1.2.3. Resultados y discusión del diseño de experiencias.

En la [Figura 104], se presentan los valores de recuperación obtenidos para cada uno de los HAP8 en cada una de las 16 experiencias realizadas en el diseño. Las condiciones de cada una de las experiencias se incluyen en [Tabla 141].

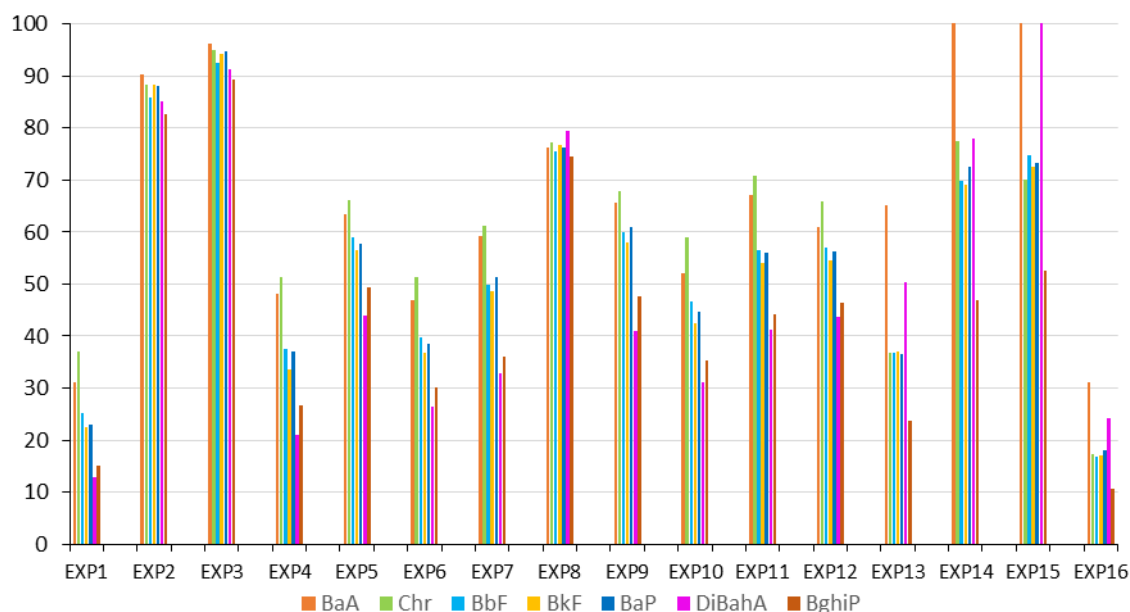


Figura 104. Gráfico de los valores de recuperación obtenidos para cada uno de los HAP8, en cada una de las experiencias realizadas en el diseño propuesto.

Como se observa en la [Figura 104], la experiencia 3 que consiste en realizar la saponificación con tres volúmenes de muestra de potasa metanólica, a 80°C durante 2 horas, seguida de tres extracciones líquido-líquido con hexano, es la opción que proporciona mejores resultados, con

valores de recuperación para todos los HAPs superiores al 90%. Es importante destacar, que es la experiencia que somete a la muestra a las condiciones más extremas ensayadas, tanto a nivel de saponificación (máximo volumen de potasa metanólica con la reacción realizada a mayor temperatura y tiempo de saponificación) como de extracción (tres extracciones L-L).

Después de la experiencia 3, las experiencias 2 y 8 son las que presentan mejores resultados. Aun así, estas dos experiencias tienen en común la temperatura de saponificación (50°C) y el volumen de potasa metanólica utilizado (3V), pudiendo dar idea que el volumen de potasa metanólica alto es imprescindible para obtener buenos resultados de recuperación.

Después de considerar las experiencias con las que se obtienen mejores resultados, es importante considerar las que sus recuperaciones son más bajas. Esto corresponde a las experiencias 1 y 16, que no tienen ningún parámetro en común. Sin embargo, si se analizan estas dos experiencias de forma independiente, se puede decir que en la experiencia 1 las recuperaciones bajas pueden ser consecuencia a un volumen de potasa metanólica insuficiente (propone el mínimo volumen, 1V) y/o a un número insuficiente de extracciones L-L. En el caso de la experiencia 16, propone trabajar con diclorometano/acetona como disolvente de extracción y, a pesar de que todas las condiciones de trabajo son las máximas propuestas, la temperatura de saponificación es la mínima.

Es importante descartar también que en las experiencias 13, 14, 15 y 16, experiencias donde se ha trabajado con la mezcla de diclorometano/acetona (50:50) para realizar la extracción de los HAPs, después de la reacción de saponificación, se observa un aumento de recuperaciones correspondientes al BaA y al DiBaH_A, respecto al resto de los HAPs. Esto se interpreta con la presencia de una interferencia que bien forma parte de la matriz y no ha sido separada durante el procedimiento de preparación de la muestra, o es un producto de la reacción de la saponificación. En cualquiera de los dos casos, esta mezcla se descarta a la hora de diseñar el procedimiento de preparación de la muestra.

Aunque estudiando las experiencias de forma individual se ha observado una ligera tendencia sobre cuáles son las mejores condiciones de trabajo, se procede a analizar los resultados mediante un análisis de la ANOVA de Pareto. En la [Tabla 142], se presentan las contribuciones de cada uno de los factores y las interacciones consideradas.

Tabla 142. Tabla de contribuciones de cada uno de los factores considerados en el diseño de experiencias después de realizar el análisis de la ANOVA de Pareto.

| Factor | Contribución (%) | Interacción | Contribución (%) |
|--------------------------------------|------------------|--------------|------------------|
| B: tiempo de saponificación | 1,3 | A x B | 1,4 |
| C: Temperatura saponificación | 0,4 | A x C | 0,9 |
| E: Volumen de KOH | 1,5 | B x C | 24 |
| A: disolvente de extracción | 1,5 | | |
| D: Número de extracciones | 0,5 | | |
| Error asociado al resultado | 68 | | |

Como se observa en la [Tabla 142], los factores que presentan mayor contribución en el modelo propuesto son la interacción entre los factores BxC (tiempo y temperatura de saponificación) con un 24%, y el error asociado al resultado, que ocupa casi un 70%. Por esta razón, el diseño de experiencias no permite extraer conclusiones sobre la contribución de los factores de forma individual, ya que parece que todos son del mismo orden. Para disminuir el error asociado al resultado, se deberían de tener varios replicados de cada una de las experiencias propuestas. En lo que hace referencia a las interacciones, es de esperar que las interacciones correspondientes a los factores AxB y AxD, sean poco importantes ya que corresponden interacciones entre las dos etapas del proceso (reacción de saponificación y extracción L-L) y es de esperar que ambas sean independientes.

Se ha observado que en la reacción de saponificación, se obtienen mejores resultados cuando se trabaja con las condiciones máximas de temperatura, tiempo y volumen de potasa metanólica. Además, en lo que hace referencia a la extracción líquido-líquido, trabajar con hexano como disolvente de extracción y con el máximo número de extracciones, es la combinación que rinde mejores resultados de extracción.

Así, en la [Tabla 143] se presentan las condiciones de preparación fijadas en lo que hace referencia a la preparación de la muestra.

Tabla 143. Condiciones de preparación de la muestra después de realizar el diseño de experiencias.

| Factor | Condiciones |
|------------------------------------|-------------------------------|
| SAPONIFICACIÓN | |
| Volumen de KOH (metanólica) | 3 veces el volumen de muestra |
| Temperatura | 80°C |
| tiempo | 2 horas |
| EXTRACCIÓN L-L | |
| Disolvente | Hexano |
| Número de extracciones | 3 |

1.2.4. Redimensión del procedimiento de preparación de muestra.

En los ensayos realizados hasta el momento, se propone trabajar con 2,5 mL de muestra de leche, realizar el proceso de saponificación, la extracción líquido-líquido con hexano, secado del extracto orgánico con sulfato de sodio, con posterior filtración, concentración y reconstitución con 1 mL de acetonitrilo. En estas condiciones, suponiendo que el extracto se inyectará por UHPLC-FLU, en el método propuesto en el primer capítulo de la presente tesis, el límite de cuantificación, expresado como disolución de patrón inyectado, es de 1 ng/mL para cada uno de los HAPs a estudio. En estas condiciones, la concentración mínima en la muestra que se podría determinar serían 0,4 µg de HAPs por kg de leche. Esta concentración es insuficiente. Sería

necesario conseguir determinar una concentración del orden de 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de leche, si se tienen en cuenta los resultados de HAPs encontrados en bibliografía

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se propone trabajar con 10 mL de leche (≈ 10 g de leche) y reconstituir el extracto obtenido a 100 μL . De esta manera, la concentración límite que se podría determinar para cada uno de los HAPs sería de 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de leche (100 veces inferior al límite legislado en muestras de leche de bebés o de continuidad).

Este aumento en la cantidad inicial de la muestra (de 2,5 mL a 10 mL), obliga a redimensionar el volumen de alguno de los reactivos utilizados en el procedimiento de preparación de la muestra. Así, el volumen de potasa metanólica y el volumen de disolvente de extracción se deberían multiplicar por cuatro. En cambio, se mantendrá las tres extracciones líquido-líquido propuestas.

Las nuevas condiciones de preparación de la muestra, se presentan a continuación:

- *Muestra*: tomar 10 mL de leche, con control de pesada
- *Saponificación*: con 30 mL de potasa metanólica, durante 2 horas a 80°C.
- *Extracción líquido-líquido*: con 10 mL de hexano (repetir este proceso 3 veces)
- *Secado* del extracto orgánico con sulfato de sodio y posterior *filtración*
- *Concentración* a sequedad con nitrógeno
- *Reconstitución* con 100 μL de acetonitrilo
- *Inyección* del extracto por UHPLC-FLU

1.3. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS HAP8 EN MUESTRAS DE LECHE.

A continuación se adjunta de forma resumida, la descripción del procedimiento propuesto para la determinación de los HAP8 en muestra de leche. El procedimiento descrito es el que será validado.

Características generales

| | |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Analitos | BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP e IP (HAP8) |
| Matriz | Leche cruda o comercial |
| Rango de trabajo | HAPs individuales: 0,01 a 10 µg/kg HAP4 (Σ BaA, Cry, BbF, BaP): 0,04-40 µg/kg HAP8 (Σ BaA, Cry, BbF, BaP, BkF, DiBahA, BghiP, IP) 0,08-80 µg/kg |
| Técnica de análisis | UHPL-FLU |
| Límites especificación legislados | <i>No existen límites legislados para leches crudas, ni leches comerciales. En este caso, se incluyen los valores legislados de HAPs (Reglamento 2006/1881/CE) correspondiente a las categorías de alimentos que pueden tener relación con la categoría a estudio:</i> 1) <i>Leches de bebés o de continuidad:</i> BaP i HAP4 → inferior a 1 µg/kg 2) <i>Aceites y grasas (siempre que el resultado se expresen en µg/kg de grasa presente en la leche):</i> BaP → inferior a 2 µg/kg HAP4 → inferior a 10 µg/kg |

Conservación y acondicionamiento de las muestras

| | |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Conservación | Las muestras se conservan en el congelador a -20°C hasta el momento de ser analizadas. En el caso de disponer de demasiado volumen por muestra, las muestras se pueden separar en diferentes alícuotas, perfectamente etiquetadas, también en el congelador. |
| Acondicionamiento | <u>Descongelación de las muestras:</u> introducir la muestra congelada en un horno a 50°C durante un tiempo aproximado de 15 minutos (hasta total descongelación de la muestra). <u>Homogeneización:</u> agitar vigorosamente el recipiente que contiene la muestra, antes de tomar la alícuota que será analizada |

Preparación de reactivos

| | |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| KOH (metanólica) | Disolución de KOH 2M en metanol: Pesar unos 39,6 g de hidróxido de potasio en un vaso de precipitados de 500 mL. Adicionar 300 mL de metanol y disolver completamente en un baño de ultrasonidos. |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Preparación inicial de la muestra

| | |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Muestra | En un erlenmeyer de 250 mL, pesar 10 g de muestra de leche. Adicionar posteriormente 10 mL de KOH (metanólica). |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Tratamiento de la muestra

| | |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Saponificación | Introducir la muestra tapada con tapón de vidrio esmerilado en un horno a 80°C durante 2 horas. Posteriormente, sacar la muestra del horno y dejar temperar. |
| 2. Extracción líquido-líquido de los HAPs | Adicionar 10 mL de hexano en el mismo erlenmeyer en que está la muestra después de la saponificación. Agitar y con una pipeta <i>pasteur</i> , separar la fracción orgánica (superficial). Repetir el proceso de extracción dos veces más, juntado los extractos orgánicos en un vial de cómo mínimo 30 mL, tipo tubo <i>clíc</i> . |
| 3. Secado y filtración del extracto orgánico | Adicionar sulfato de sodio en el vial donde se tiene el extracto orgánico. La cantidad a adicionar depende de la cantidad de agua que tenga el extracto orgánico. No utilizar el tapón de plástico del vial tubo <i>clíc</i> para tapar el extracto [página 355] Pasar a través de un papel de filtro colocado en un embudo el extracto seco, para separar el sulfato de sodio. Introducir el extracto orgánico filtrado en un tubo de <i>TurboVap</i> [®] (volumen aproximado de 30 mL). |
| 4. Concentración del extracto | El extracto orgánico que se tiene un tubo de <i>TurboVap</i> [®] se concentra hasta 5 mL con corriente de nitrógeno, limpiando continuamente las paredes del tubo con hexano. Pasar con una pipeta <i>Pasteur</i> el extracto concentrado a un tubo graduado de fondo cónico de 10 mL y acabar de concentrar a sequedad con corriente de nitrógeno. |
| 5. Reconstitución | Adicionar 100 µL de acetonitrilo en el mismo tubo graduado de fondo cónico donde se ha concentrado el extracto (controlando el volumen añadido por pesada). Agitar en un baño de ultrasonidos y transvasar el extracto a un vial de inyector automático de 2 mL con <i>microinserto</i> . |

Análisis por UHPLC-FLU

| | |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sistema | <i>Acquity</i> UPLC [®] con detector de fluorescencia <i>Acquity</i> de <i>Waters</i> |
| Patrones de calibración | 1, 10, 50, 100, 250, 500 y 1000 ng/mL Rango equivalente en muestra: 0,01 a 10 µg/kg. Los patrones se preparan por dilución sucesivas a partir de un patrón conjunto de HAPs (PAH MIX9 d <i>Dr. Ehrenstorfer</i> ref.: XA20950009AL, concentración 100 mg/L) |
| Columna | <i>Zorbax Eclipse PAH</i> (50 X 3 mm; 1,8 µm) |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Condiciones cromatográficas | Volumen de inyección: 2 μ L. Temperatura de la columna: 33,0 \pm 2,0°C Flujo: 0,77 mL/min Fase móvil: (A) Agua MilliQ (B) Metanol/Acetonitrilo (50:50) Programa de gradiente : 0,00 min: 50% FM(B) – <i>gradiente lineal</i> 1,85 min: 71% FM(B) – <i>gradiente lineal</i> 3,64 – 5,00 min: 100% FM(B) 5,09 – 6,00 min: 50% FM(B) – <i>equilibrado condiciones iniciales</i> |
| Condiciones de detección (FLU) Nota: permite la detección de los 16 EPA-HAPs | CANAL A: 0,00 – 2,80 min: $\lambda_{ex} = 250/\lambda_{em} = 376$ nm (Fe, An) 2,80 – 3,65 min: $\lambda_{ex} = 333/\lambda_{em} = 390$ nm (Pyr) 3,65 – 6,00 min: $\lambda_{ex} = 318/\lambda_{em} = 510$ nm (IP) CANAL B: 0,00 – 2,60 min: $\lambda_{ex} = 280/\lambda_{em} = 340$ nm (Na, Ace, Flu) 2,60 – 3,10 min: $\lambda_{ex} = 285/\lambda_{em} = 450$ nm (Flt) 3,10 – 6,00 min: $\lambda_{ex} = 296/\lambda_{em} = 405$ nm (BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP) |

Cuantificación

| | |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Cuantificación | La cuantificación se realiza por interpolación en recta de calibrado |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------|

1.4. VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS HAP8 EN MUESTRAS DE LECHE.

El procedimiento descrito para la determinación de los HAP8 en muestras de leche se ha validado. Para ello, se tienen en cuenta los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, límites de detección y cuantificación, repetibilidad de inyección, precisión (repetibilidad), exactitud e incertidumbre.

La muestra que se utiliza para llevar a cabo la validación es la misma muestra que se ha utilizado en la puesta a punto del procedimiento. Corresponde a la leche fresca comercial pasteurizada (contenido en grasa entre el 3,5-4% p/p).

Antes de realizar la validación, se escribe el protocolo donde se incluyen los criterios de aceptación, las disoluciones y los parámetros a realizar. A continuación, se presenta de forma resumida, tanto los criterios de aceptación como las disoluciones utilizadas durante la validación.

1.4.1. Definición de los criterios de aceptación.

En la [Tabla 144], se presentan los criterios de aceptación establecidos para los diferentes parámetros de calidad incluidos en la validación del procedimiento.

Tabla 144. Criterios de aceptación establecidos para el procedimiento para determinación de los HAP8 en muestras de leche (previos a la validación)

| Parámetro | Criterio de aceptación |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | Sin interferencias ni en material, ni en los disolventes utilizados. |
| Selectividad | <p><i>Nota: se considerará que no hay interferencias de matriz si se cumple el criterio de aceptación de exactitud.</i></p> <hr/> <p>Para los 8 HAPs a estudio, en el rango de concentraciones de 1 ng/mL a 1000 ng/mL:</p> <ul style="list-style-type: none"> - En el ajuste por mínimos cuadrados: $R^2 \geq 0,99$. - El coeficiente de variación (CV%) de los factores de respuesta ha de ser inferior al 15%. |
| Linealidad | <p>Se valoraran las rectas obtenidas. Así, tanto la ordenada en el origen como la pendiente han de ser estadísticamente significativas, según el test de <i>Student</i> ($p=95\%$).</p> <ul style="list-style-type: none"> - Las ordenadas deben de ser estadísticamente igual a cero. - Las pendientes deben de ser estadísticamente diferentes de cero. |
| LOD y LOQ | <p>El LOD para cualquiera de los HAP8 debe de ser inferior o igual a 0,004 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (equivalente a 0,4 ng/mL en disolución inyectada).</p> <p>El LOQ para cualquiera de los HAP8 debe de ser inferior o igual a 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (equivalente a 1 ng/mL en disolución inyectada).</p> |
| Repetibilidad inyección | <p>El coeficiente de variación de las áreas obtenidas de 10 repeticiones de inyección consecutivas del patrón de 10 ng/mL debe ser inferior o igual al 1%. ($CV_{\text{área}} \% (n=10) \leq 1\%$)</p> |
| Precisión | <p>Para cada uno de los niveles de concentración estudiados (bajo: 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$; medio: 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$; alto: 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y para cada uno de los HAP8:</p> <p>El coeficiente de variación de los tres replicados realizados debe de ser inferior o igual al 30%.</p> |
| Exactitud | <p>Para cada uno de los niveles de concentración estudiados (bajo: 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$; medio: 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$; alto: 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$):</p> <ul style="list-style-type: none"> - La recuperación promedio para todos los HAPs ha de ser superior o igual al 50%. - El coeficiente de variación de las recuperaciones para los diferentes HAPs a cada nivel de concentración estudiado ha de ser inferior o igual al 10%. |
| Rango de trabajo | Para todos los HAP8: 0,01 a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de leche |
| Incertidumbre | Para todos los HAP8: $u_{\text{global}} < 30\%$ |

Los criterios de aceptación establecidos para la validación del procedimiento cumplen con los criterios exigidos en el Reglamento nº 333/2007, donde se fijan los criterios de aptitud aplicables a los métodos de análisis para el control de BaP en matrices alimentarias [Tabla 11].

Así, se cumple que:

- Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) exigidos en esta tesis son de 0,004 y 0,01 µg/kg, respectivamente. Estos valores son unas diez veces inferiores a los valores exigidos en el reglamento de referencia (LOD ≤ 0,3 µg/kg; LOQ ≤ 0,9 µg/kg).
- Los valores de recuperación aceptados en el Reglamento son del 50% al 120%, por lo que también se cumple con el criterio establecido para el procedimiento a estudio.
- Para la precisión se fija como criterio el valor de HORRAT_r. Este se define en el reglamento como el valor estimado con la ecuación de Horwitz [Ecuación 21]

$$CV(\text{Horwitz})(\%) = 2^{(1-0,5\log C)}$$

Donde. C es la concentración de analito expresada en g/mL.

Ecuación 21. Ecuación de Horwitz para determinar el CV (%) en los estudios de precisión.

En este caso, si se considera una concentración de 0,01 µg/kg (equivalente a 0,01 µg/L), el valor de C corresponde a 0,01*10⁻⁶ g/mL. De manera que el CV de Horwitz será del 32%.

Este coeficiente de variación es del mismo orden del que se ha exigido en el procedimiento.

- En el Reglamento, la incertidumbre estándar máxima (no ampliada) expresada en µg/kg, se calcula siguiendo la siguiente expresión [Ecuación 22]

$$u_f = \sqrt{\left(\frac{LOD}{2}\right)^2 + (0,2 \cdot c)^2}$$

Donde:

LOD corresponde al límite de detección y c es la concentración de interés en µg/kg.

Ecuación 22. Ecuación de la incertidumbre estándar (no ampliada) que se especifica en el Reglamento nº 333/2007.

Teniendo en cuenta que el LOD especificado es de 0,004 µg/kg y la concentración (c) mínima es de 0,01 µg/kg. La incertidumbre estándar máxima (no ampliada) sería, en este caso, de 2,8x10⁻³ µg/kg, que expresado en porcentaje respecto a la concentración mínima, sería del 28%.

Por lo que la incertidumbre ampliada (U) aplicando un factor de cobertura de 2 que da un nivel de confianza del 95% (U=2u_f), por lo que se aceptaría una incertidumbre ampliada hasta del 56%.

1.4.2. Descripción de las disoluciones que se utilizan en la validación.

A continuación se describen las disoluciones que se han preparado para realizar la validación del procedimiento para la determinación de los HAP8 en muestras de leche.

Disoluciones de patrones

Todas las disoluciones de patrones se preparan a partir del patrón concentrado PAH-MIX9 de 100 mg/L en acetonitrilo del laboratorio *Dr. Ehrenstorfer* (referencia: XA20950009AL). Como se ha comentado, esta disolución comercial incluye los 16 EPA-HAPs, entre los que se incluyen los 8 HAPs de interés.

A partir del patrón conjunto concentrado, se preparan 9 diluciones de concentraciones comprendidas entre 0,1 y 1000 ng/mL (0,1, 1, 5, 10, 50, 100, 250, 500 y 1000 ng/mL), preparadas en acetonitrilo. Este margen de concentraciones equivale a una concentración en muestra de 0,001 a 10 µg/kg.

Estas disoluciones se utilizarán para valorar la linealidad de la respuesta de los HAPs a estudio, los límites de detección y cuantificación, y se utilizarán como patrones de control para determinar la concentración de las muestras adicionadas.

Para el estudio de la repetibilidad de inyección se utilizará el patrón de 10 n/mL.

Disoluciones de las muestras y las muestras adicionadas

Para valorar la selectividad, la precisión y la exactitud del procedimiento, se prepara tanto una muestra como las muestras adicionadas a tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) que cubren el rango de concentraciones de trabajo.

A continuación se detalla la preparación de las disoluciones iniciales sobre las que se aplicará el procedimiento descrito en el apartado 1.3 del Capítulo IV (página 327).

- *Blanco de proceso*: 10 mL de agua MilliQ
- *Muestra* (no adicionada): 10 mL de leche pasteurizada comercial
- *Muestra adicionada a nivel bajo* (concentración equivalente a 0,1 µg/kg de cada uno de los HAP8 en la muestra): 10 mL de muestra + 100 µL del patrón conjunto de 10 ng/mL.
- *Muestra adicionada a nivel medio* (concentración equivalente a 1 µg/kg de cada uno de los HAP8 en la muestra): 10 mL de muestra + 100 µL del patrón conjunto de 100 ng/mL.
- *Muestra adicionada a nivel alto* (concentración equivalente a 10 µg/kg de cada uno de los HAP8 en la muestra): 10 mL de muestra + 100 µL del patrón conjunto de 1000 ng/mL.

No se realizan adiciones al nivel de 0,01 µg/kg, para no tener problemas a la hora de considerar el nivel de fondo de HAPs, ya presente en la muestra.

La preparación tanto de la muestra como de las muestras adicionadas se realiza por triplicado. Cada una de las series, se desplaza temporalmente, de manera que en ningún momento se manipulen simultáneamente muestras de diferentes niveles de adición, con la finalidad de disminuir al máximo la probabilidad de obtener contaminaciones cruzadas.

Es importante tener en cuenta, que antes de preparar tanto el blanco de proceso, como las muestras como las muestras adicionadas, se ha comprobado que el material utilizado en cada caso, está perfectamente limpio y no presenta problemas de interferencias. Para ello, con el material considerado limpio, se realiza un blanco de proceso. Los extractos obtenidos se inyectan en el cromatógrafo y se comparan con el patrón de HAPs de menor concentración de los patrones de calibración (1 ng/mL). El nivel de HAPs en los blancos debe de ser tres veces inferior al patrón límite de calibración (inferior a 0,3 ng/mL). Sólo si es así, el material podrá ser utilizado para la preparación de muestras y muestras adicionadas.

1.4.3. Resultados de validación del procedimiento para la determinación de los HAP8 en muestras de leche.

- **Selectividad**

Para determinar la selectividad, se comparan los cromatogramas correspondientes a los extractos obtenidos tanto del blanco de proceso, como de una muestra de leche como de una muestra de leche adicionada al nivel bajo de 0,1 µg/kg.

Paralelamente, también se inyectan tanto el disolvente de reconstitución (acetonitrilo) como un patrón conjunto de HAPs de 10 ng/mL, preparado también en acetonitrilo.

En la [Figura 105], se presenta la superposición de los cromatogramas obtenidos a la pareja de longitudes de onda 296/405, donde se detectan 7 de los 8 HAPs a estudio (exceptuando el IP que se detecta en el canal B a la pareja de longitudes de onda 318/510).

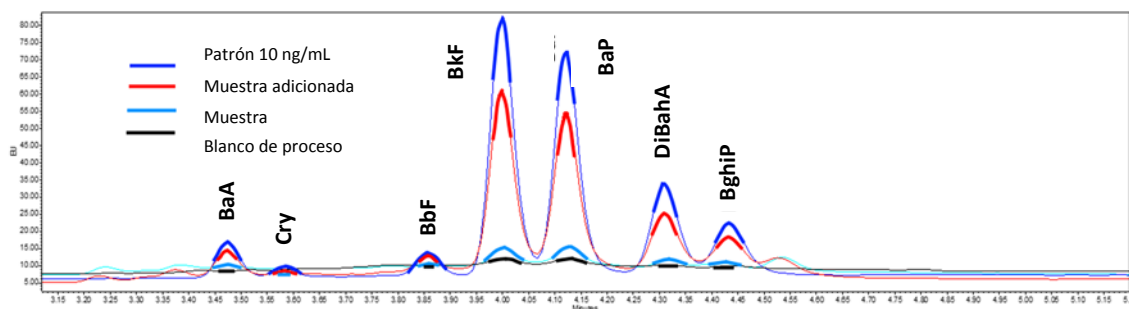


Figura 105. Superposición de los cromatogramas [296/405] tanto del blanco de proceso, como de la muestra y de la muestra adicionada a nivel bajo y un patrón de referencia de 10 ng/mL.

Como se puede observar:

- Si se compara el cromatograma del patrón con el cromatograma del blanco de proceso, no se detectan interferencias de proceso al tiempo de retención de los HAPs.
- Si se compara el cromatograma del patrón y de la muestra adicionada, se observa que aunque la recuperación no es del 100%, parece que no existen interferencias de matriz que impidan la determinación de los HAPs a estudio.
- En el cromatograma de la muestra, queda claro, que el nivel de HAPs es inferior al límite de detección, por lo que el nivel de fondo, no se considerará a la hora de calcular la concentración de los HAPs en las muestras adicionadas.

• Linealidad

Se estudia si la respuesta es lineal en el margen de concentraciones entre 1 y 1000 ng/mL de los HAP8 (concentración equivalente en muestra entre 0,01 y 10 µg/kg de HAPs en la leche).

Como para todos los HAPs se propone estudiar la linealidad tanto a partir del ajuste por mínimos cuadrados como con el estudio de los factores de respuesta, los resultados ya se han presentado en el primer capítulo de la presente tesis, en los parámetros de calidad (linealidad) relacionados con el método cromatográfico puesto a punto por UHPLC-FLU [página 146].

Como el rango de trabajo propuesto era demasiado amplio, se ha considerado necesario evaluar la linealidad en dos rangos de concentración según la concentración sea baja o alta. Los rangos de concentraciones propuestos son los siguientes:

- *Rango de concentraciones altas:* margen comprendido entre 10 y 1000 ng/mL (equivalente a 0,1 y 10 µg/kg de HAPs en la leche).
- *Rango de concentraciones bajas:* margen comprendido entre 1 y 10 ng/mL (equivalente a 0,01 y 0,1 µg/kg de HAPs en la leche).

En la [Tabla 65] y en la [Tabla 66], se presentan los resultados obtenidos del ajuste por mínimos cuadrados, en el margen de concentraciones altas y bajas, respectivamente.

En la [Tabla 67] y en la [Tabla 68], se presentan los resultados correspondientes a los factores de respuesta para cada analito, en el margen de concentraciones altas y bajas, respectivamente.

Como se puede observar en los resultados obtenidos en el ajuste por mínimos cuadrados, para los HAP8 los coeficientes de determinación (R^2) son muy superiores al criterio de aceptación establecido ($R^2 \geq 0,99$), tanto a concentraciones bajas como a concentraciones altas. Además, en todos los casos, se cumple la significación estadística tanto de la pendiente como de la ordenada en el origen.

En lo que hace referencia al estudio de la proporcionalidad de la respuesta con el coeficiente de variación de los factores de respuesta, se observa que en el rango alto (10 y 1000 ng/mL) todos los coeficientes de variación obtenidos son inferiores al 5%. En el margen de concentraciones bajas (0,1 a 10 ng/mL) aunque los coeficientes de variación obtenidos son superiores que en el rango alto, cumplen, en todos los casos, el criterio de aceptación propuesto ($CV_{\text{factores de respuesta}} < 15\%$).

Teniendo en cuenta que el cálculo de la concentración de la muestra se propone por interpolación en la recta de calibrado, es necesario conocer los valores residuales que marcarán la falta de exactitud del sistema instrumental en el cálculo de la incertidumbre. Para ello, se calculan los valores residuales, expresados en porcentaje, correspondientes a los patrones de 1, 5 y 10 ng/mL (con las rectas obtenidas en el rango de concentraciones bajo), y los residuales de los dos patrones más diluidos en el margen de concentraciones alto (10 y 50 ng/mL). Se incluyen los valores residuales que se consideran superiores en el ajuste por mínimos cuadrados.

Los valores residuales (%) se calculan como la diferencia entre el área obtenida por interpolación en la recta de calibrado y el área experimental, en valor absoluto, normalizada por el área experimental, expresada en porcentaje.

Los resultados obtenidos para cada uno de los HAP8, tanto con los patrones de rango bajo como alto, se presentan en la [Tabla 145].

Tabla 145. Valores residuales (%) calculados para los HAP8, tanto en el rango de concentraciones estudiado a nivel bajo como a nivel alto.

| Compuestos (HAP8) | Ajuste mínimos cuadrados | | | | |
|-------------------|--------------------------|---------|----------|------------|----------|
| | NIVEL BAJO | | | NIVEL ALTO | |
| | 1 ng/mL | 5 ng/mL | 10 ng/mL | 10 ng/mL | 50 ng/mL |
| BaA | 4,6 | 1,6 | 0,40 | 9,5 | 1,0 |
| Cry | 1,1 | 0,40 | 0,11 | 27 | 2,9 |
| BbF | 0,97 | 0,37 | 0,08 | 13 | 2,8 |
| BkF | 0,80 | 0,30 | 0,07 | 4,3 | 0,72 |
| BaP | 4,0 | 0,22 | 0,09 | 5,9 | 0,88 |
| DiBahA | 1,0 | 1,2 | 0,32 | 24 | 3,6 |
| BghiP | 3,4 | 1,4 | 0,33 | 14 | 1,7 |
| IP | 29 | 13 | 2,4 | 2,5 | 0,30 |

A partir de los resultados obtenidos, se establecen como rango de trabajo para todos los analitos de 1 a 1000 ng/mL. Pero a nivel de cuantificación, se prefiere trabajar con dos rectas de calibrado diferentes en función de si la muestras se encuentra a nivel bajo (entre 0,01 y 0,1 µg/kg) o a nivel alto (superior a 0,1 e inferior a 10 µg/kg).

- **LOQ y LOD**

El cálculo del LOQ y del LOD se realiza de forma teórica a partir de la relación señal/ruido [Ecuación 2]. En este caso, el ruido (N) corresponde al ruido promedio calculado entre los minutos 5,50 y 6,20 de los cromatogramas. El patrón de 1 ng/mL permite obtener la señal que se tomará como referencia para el cálculo de las concentraciones correspondientes al LOQ/LOD.

En la [Tabla 146] se presentan las concentraciones límite (LOQ/LOD) para cada uno de los HAPs a estudio. Se incluye tanto la relación señal/ruido (S/N) como la concentración LOQ y LOD, expresada en µg/kg de muestra (suponiendo que se toman 10 g de muestra de leche y que el extracto obtenido se concentra a 100 µL).

Tabla 146. Concentraciones límite (LOQ/LOD) para los HAP8, según el procedimiento para su determinación en muestras de leche.

| Compuesto (HAP8) | S/N | LOQ [µg/kg] | LOD [µg/kg] |
|------------------|-----|-------------|-------------|
| BaA | 24 | 0,0043 | 0,0013 |
| Cry | 7 | 0,0139 | 0,0042 |
| BbF | 13 | 0,0075 | 0,0023 |
| BkF | 155 | 0,0006 | 0,0002 |
| BaP | 149 | 0,0007 | 0,0002 |
| DiBahA | 61 | 0,0016 | 0,0005 |
| BghiP | 42 | 0,0024 | 0,0007 |
| IP | 13 | 0,0078 | 0,0023 |

Como se puede observar, en todos los casos los LOQ y LOD son inferiores o iguales a 0,01 µg/kg y 0,004 µg/kg en muestra, respectivamente

El valor más alto corresponde al criseno, el cual presenta un LOQ y LOD igual a los límites establecidos para estos dos parámetros (0,01 µg/kg y 0,004 µg/kg, respectivamente). Este resultado es del todo esperable ya que el criseno es el HAP8 con menos señal.

- **Repetibilidad de inyección**

Para determinar la repetibilidad de inyección, se inyectan 7 veces seguidas el patrón conjunto de 10 ng/mL y se determina el coeficiente de variación de las áreas de cada uno de los 8 compuestos a estudio. En la [Tabla 147] se presenta el área promedio obtenida y su coeficiente de variación.

Tabla 147. Estudio de la repetibilidad de inyección. Área promedio (n=7) de cada uno de los HAP8 en el patrón conjunto de 10 ng/mL y el coeficiente de variación (CV%) asociado.

| Compuesto (HAP8) | Área promedio | CV% |
|------------------|---------------|------|
| BaA | 5107575 | 0,25 |
| Cry | 1272733 | 0,42 |
| BbF | 2909380 | 0,37 |
| BkF | 32541606 | 0,21 |
| BaP | 30223446 | 0,17 |
| DiBahA | 13722810 | 0,27 |
| BghiP | 8534770 | 0,19 |
| IP | 1463162 | 0,56 |

Como se puede observar, el coeficiente de variación de las áreas de 7 inyecciones seguidas de un patrón conjunto de 10 ng/mL es inferior al 1% para cualquiera de los HAPs de interés. De manera que se cumplen los criterios de aceptación establecidos. Aunque también es importante destacar, que la repetibilidad de inyección obtenida con el sistema de UHPLC es equivalente a la que se obtiene en un cromatógrafo de líquidos convencional.

Así, se puede concluir que el método de inyección tiene una repetibilidad adecuada.

• Exactitud y precisión

La exactitud del procedimiento se determina calculando la recuperación de las muestras adicionadas a 3 niveles de concentración que cubren el rango de trabajo. Los niveles de concentración estudiados son los siguientes:

- Nivel bajo: 0,1 µg/kg
- Nivel medio: 1 µg/kg
- Nivel alto: 10 µg/kg

Previamente a las muestras adicionadas, se analiza una muestra de leche fresca comercial sin adicionar para poder determinar el nivel de HAP8 de fondo. Se obtiene que la concentración de los 8 HAPs a estudio es inferior a 0,01 µg/kg, así que la concentración se puede considerar despreciable sobre las adiciones realizadas y no se tendrá en cuenta a la hora de calcular las recuperaciones.

Para calcular la precisión, se realizan tres preparaciones independientes de muestra adicionada a cada uno de los niveles de adición considerados para determinar la exactitud. La variabilidad, expresada como el coeficiente de variación (%) de las recuperaciones obtenidas entre las tres preparaciones de cada nivel corresponde a la precisión del procedimiento para cada nivel de adición.

En la [Tabla 148], se presentan los resultados de precisión (CV%) y exactitud (R%) obtenidos para cada uno de los HAPs a estudio.

Tabla 148. Resultados del estudio de precisión y exactitud del procedimiento para la determinación de HAP8 en muestras de leche. Se realiza a tres niveles de concentración: nivel bajo, medio y alto, y se realizan tres replicados (n=3) a cada uno de los niveles.

| Compuesto (HAP8) | NIVEL BAJO (0,1 µg/kg) | | NIVEL MEDIO (1 µg/kg) | | NIVEL MEDIO (10 µg/kg) | |
|---------------------|------------------------|-----------|-----------------------|-----------|------------------------|-----------|
| | R% promedio | CV% (n=3) | R% promedio | CV% (n=3) | R% promedio | CV% (n=3) |
| BaA | 90,3 | 12 | 56,3 | 16 | 50,3 | 14 |
| Cry | 79,2 | 27 | 55,1 | 18 | 50,6 | 14 |
| BbF | 95,1 | 19 | 57,6 | 19 | 51,4 | 12 |
| BkF | 78,5 | 5,5 | 56,3 | 18 | 51,3 | 12 |
| BaP | 82,6 | 6,3 | 56,5 | 18 | 50,7 | 12 |
| DiBahA | 76,8 | 4,5 | 54,4 | 20 | 52,1 | 11 |
| BghiP | 80,8 | 4,8 | 57,1 | 21 | 47,6 | 10 |
| IP | 77,5 | 7,0 | 53,5 | 21 | 48,4 | 11 |
| HAP promedio | 83 | --- | 56 | --- | 50 | --- |
| CV% | 8,1 | --- | 2,5 | --- | 3,1 | --- |

Si se evalúan los resultados desde el punto de vista de la precisión, todos los valores cumplen con el criterio de aceptación establecido (CV<30%). A nivel bajo, se puede observar que la variabilidad de los compuestos menos pesados (BaA, Cry y BbF) es mayor que la de los menos pesados (BkF, BaP, DiBahA, BghiP e IP). Sin embargo, tanto a nivel medio como a nivel alto de adición la variabilidad de todos los compuestos es comparable.

Desde el punto de vista de la exactitud, todos los valores de recuperación obtenidos son superiores al 50% (criterio de aceptación establecido). Aunque, cabe destacar, que a nivel bajo se obtienen recuperaciones superiores al 75% para todos los HAPs y se obtiene una recuperación promedio del 83%, mientras que a nivel medio y alto las recuperaciones son más bajas y se encuentran cercanas al 50% (recuperaciones promedio de todos los HAPs del 56% y 50%, respectivamente). Este hecho es favorable ya que, la concentración de los HAP8 en muestras de leche, acostumbra a ser próxima a la adición a nivel bajo, indicando que no hay interferencias de matriz significativas. Pero los valores de recuperación inferiores a nivel medio y alto podrían indicar que los HAPs se pierden en alguno de los puntos del procedimiento.

De esta manera, se puede concluir que el procedimiento presenta una exactitud y una precisión adecuadas en el rango de concentraciones de trabajo (0,01 a 10 µg/kg de leche). Aunque se propone que:

- Si la muestra se encuentra a nivel bajo ($\leq 0,1 \mu\text{g/kg}$), no se corrige por la recuperación.
- Si la muestra se encuentra a nivel medio o alto (entre 0,1 y 10 µg/kg), se debe corregir por la recuperación promedio, sin discernir entre los diferentes HAPs (recuperaciones de 56% y 50%, respectivamente).

• **Incertidumbre**

A partir de los resultados de validación se propone calcular la incertidumbre del procedimiento, igual que se ha realizado en el cálculo de la incertidumbre en el procedimiento de determinación de HAPs en muestras de inmisiones atmosféricas. (Gotor, Blanco, & Broto-Puig, 2008)

Así, la incertidumbre combinada se calcula como la raíz cuadrada de la suma cuadrática de la incertidumbre asociada al patrón, al sistema instrumental y a la muestra [Ecuación 13].

La incertidumbre asociada al patrón ($u_{\text{patrón}}$) depende de la incertidumbre asociada a la tolerancia del patrón (proporcionada por el fabricante para el lote de PAH MIX9 utilizado en la validación) y a la preparación por dilución. La incertidumbre asociada al sistema instrumental ($u_{\text{instrumento}}$) depende de la exactitud y de la precisión asociada al método de cálculo con el sistema de UHPLC-FLU. La incertidumbre de exactitud está asociada a la residual, ya que el cálculo de las muestras se realiza por interpolación, mientras que la precisión se asocia con la repetibilidad de inyección. Finalmente, la incertidumbre asociada a la muestra (u_{muestra}), incluye tanto la exactitud como la precisión, resultados obtenidos directamente de los dos parámetros de validación. En este caso, tampoco se considera la preparación de la muestra ya que está incluido dentro de la precisión del procedimiento, que implica tres preparaciones independientes.

Para el cálculo de la **incertidumbre del patrón de cuantificación** es necesario tener en cuenta que:

- La tolerancia del patrón conjunto PAH MIX 9 de 100 mg/L, proporcionada para todos los HAPs, es del 5%. Así, la incertidumbre asociada a la tolerancia del patrón será para todos los HAPs:

$$u_{\text{tolerancia}}(\%) = \frac{5}{\sqrt{3}} \cdot \frac{1}{100 \frac{\text{mg}}{\text{L}}} \cdot 100 = 2,89$$

- La incertidumbre asociada a la preparación de los patrones, depende de los patrones que se consideran en la calibración para el cálculo de las muestras. Como se ha separado en dos márgenes, uno a nivel bajo y otro a nivel alto, el cálculo de la incertidumbre de la preparación de los patrones se asocia a la preparación de los patrones más diluidos de cada uno de los márgenes de trabajo. Es decir, el patrón de 1 ng/mL para el nivel bajo de concentraciones y el de 10 ng/mL para el de nivel alto.

Cabe destacar que los patrones, se preparan por dilución desde un patrón de 1000 ng/mL. Así, primero se calcula la incertidumbre asociada a la preparación del patrón de 1000 ng/mL, considerando la incertidumbre de la pesada del volumen de dilución y la asociada a la dilución. Y después la incertidumbre de cada uno de los otros patrones diluidos. [Ecuación 14]

Así, la incertidumbre de preparación de cada patrón corresponde a la incertidumbre combinada de la suma cuadrática de la incertidumbre asociada a la tolerancia del patrón, la incertidumbre de preparación del patrón de 1000 ng/mL y la incertidumbre asociada a cada una de las diluciones correspondientes al patrón de 10 ng/mL y de 1 ng/mL. Los resultados se presentan en la [Tabla 149]

Tabla 149. Incertidumbre asociada a la preparación del patrón de cuantificación, tanto a nivel bajo como a nivel medio-alto. Esta incertidumbre coincide para todos los HAPs a estudio.

| Patrón cuantificación | $u_{\text{tolerancia}} (\%)$ | $u_{\text{patrón madre}} (\%)$ [1000 ng/mL] | $u_{\text{patrón diluida}} (\%)$ [ng/mL] | $u_{\text{patrón}} (\%)$ |
|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------|
| NIVEL BAJO 1 ng/mL | 2,89 | 0,33 | 0,32 | 2,92 |
| NIVEL MEDIO-ALTO 10 ng/mL | 2,89 | 0,33 | 0,34 | 2,93 |

Para el cálculo de la **incertidumbre del sistema instrumental** se considera, tanto la exactitud como la precisión relacionadas con el sistema instrumental, utilizado para la cuantificación de las muestras.

Así, se tiene en cuenta que:

- La incertidumbre asociada a la precisión del instrumento ($u_{\text{precisión instrumental}}$) corresponde al coeficiente de variación (CV%) obtenido en el estudio de la repetibilidad de inyección para cada uno de los HAPs [Ecuación 15], pero con un valor de $n=7$.
- La incertidumbre de la exactitud del instrumento ($u_{\text{exactitud instrumental}}$) corresponde al valor residual ya que el cálculo de las muestras se realiza por interpolación. Se propone considerar el valor residual del patrón de 1 ng/mL cuando se trabaja con la recta a nivel bajo, y con el del patrón de 50 ng/mL cuando se trabaja a nivel medio-alto. En este último caso, no se considera el valor residual del patrón de 10 ng/mL porque, tal y como se ha indicado, si la muestra se encuentra a este nivel se debe cuantificar con la recta a nivel bajo [Ecuación 23].

$$u_{\text{exactitud instrumental}} = \frac{\text{residual}\%}{\sqrt{3}}$$

Ecuación 23. Fórmula aplicada para el cálculo de la incertidumbre asociada a la exactitud del sistema instrumental, en el procedimiento para la determinación de HAPs en muestras de leche.

En la [Tabla 150], se presentan los valores de incertidumbre combinada asociada con el sistema instrumental, para cada uno de los HAPs a estudio a cada uno de los dos posibles niveles de concentración.

Tabla 150. Incertidumbre asociada al sistema instrumental, tanto a nivel bajo como a nivel medio-alto.

| Compuesto (PAH8) | $u_{\text{precisión}}$ (%) * | $U_{\text{exactitud}}$ (%) ** [NIVEL BAJO] | $U_{\text{exactitud}}$ (%) ** [NIVEL MEDIO-ALTO] | u_{SI} (%) [NIVEL BAJO] | u_{SI} (%) [NIVEL MEDIO-ALTO] |
|------------------|------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------|
| BaA | 0,09 | 2,66 | 0,58 | 2,7 | 0,59 |
| Cry | 0,16 | 0,64 | 1,67 | 0,65 | 1,7 |
| BbF | 0,14 | 0,56 | 1,62 | 0,58 | 1,6 |
| BkF | 0,08 | 0,46 | 0,42 | 0,47 | 0,42 |
| BaP | 0,06 | 2,31 | 0,51 | 2,3 | 0,51 |
| DiBahA | 0,10 | 0,58 | 2,08 | 0,59 | 2,1 |
| BghiP | 0,07 | 1,96 | 0,98 | 2,0 | 0,98 |
| IP | 0,21 | 16,74 | 0,17 | 17 | 0,27 |

SI: sistema instrumental.

(*) CV(%) obtenido para cada uno de los HAPs en la [Tabla 147]

(**) Valores de residuales (%) obtenidos para cada uno de los HAPs a los dos niveles de concentración (1 ng/mL a nivel bajo; 50 ng/mL a nivel alto) en la [Tabla 145]

Para el cálculo de la **incertidumbre de la muestra** se considera, tanto la exactitud como la precisión calculadas en la validación.

Así, se tiene en cuenta que:

- La incertidumbre asociada a la precisión de la muestra ($u_{\text{precisión muestra}}$) corresponde al coeficiente de variación (CV%) obtenido en el estudio de precisión de la muestra para cada uno de los HAP8. Se aplicará la [Ecuación 15], con $n=3$ (correspondiente al n).
- La incertidumbre asociada a la exactitud de la muestra ($u_{\text{exactitud muestra}}$) viene determinada por el sesgo obtenido en el estudio de exactitud. El sesgo corresponde a la diferencia entre la recuperación obtenida y el 100%. Para el cálculo de la incertidumbre se utilizará la [Ecuación 23], pero cambiando el valor residual (%) por el sesgo (%).

En la [Tabla 151], se presentan los valores de incertidumbre combinada asociada a la muestra, para cada uno de los HAPs a estudio a cada uno de los dos posibles niveles de concentración. Como en este caso, se tienen valores de exactitud y precisión a tres niveles de concentración se incluirá el nivel bajo de forma independiente y el nivel medio-alto se considerará globalmente, considerando el valor más desfavorable. También es importante destacar, que como a nivel medio-alto se propone corregir el valor por la recuperación promedio, como incertidumbre de exactitud se considerará la diferencia entre el valor de corrección y el valor obtenido realmente.

Tabla 151. Incertidumbre asociada a la muestra, tanto a nivel bajo como a nivel medio-alto, para cada uno de los HAPs de estudio

| Compuesto (PAH8) | NIVEL BAJO | | NIVEL ALTO | |
|------------------|------------|--------|-------------|--------|
| | Sesgo (%)* | CV(%)* | Sesgo (%)** | CV(%)* |
| BaA | 9,7 | 12 | 0 | 14 |
| Cry | 20,8 | 27 | 0,3 | 14 |
| BbF | 4,9 | 19 | 1,1 | 12 |
| BkF | 21,5 | 5,5 | 1 | 12 |
| BaP | 17,4 | 6,3 | 0,4 | 12 |
| DiBahA | 23,2 | 4,5 | 1,8 | 11 |
| BghiP | 19,2 | 4,8 | 2,7 | 10 |
| IP | 22,5 | 7 | 1,9 | 11 |

(*) Sesgo (%) calculado a partir de la recuperación (%) y CV(%) obtenidos en la [Tabla 148]

(**) A nivel alto, como se corrige por la recuperación promedio (50%), el sesgo incluido en este caso se calcula como la diferencia entre la recuperación promedio y el valor obtenido para cada uno de los compuestos.

| Compuesto (PAH8) | NIVEL BAJO | | NIVEL ALTO | | Nivel bajo | Nivel alto |
|------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|------------|
| | U _{exactitud} | U _{precisión} | U _{exactitud} | U _{precisión} | U _{muestra} (%) | |
| BaA | 5,6 | 6,9 | 0,0 | 8,1 | 8,9 | 8,1 |
| Cry | 12,0 | 15,6 | 0,2 | 8,1 | 19,7 | 8,1 |
| BbF | 2,8 | 11,0 | 0,6 | 6,9 | 11,3 | 7,0 |
| BkF | 12,4 | 3,2 | 0,6 | 6,9 | 12,8 | 7,0 |
| BaP | 10,0 | 3,6 | 0,2 | 6,9 | 10,7 | 6,9 |
| DiBahA | 13,4 | 2,6 | 1,0 | 6,4 | 13,6 | 6,4 |
| BghiP | 11,1 | 2,8 | 1,6 | 5,8 | 11,4 | 6,0 |
| IP | 13,0 | 4,0 | 1,1 | 6,4 | 13,6 | 6,4 |

A partir de los valores individuales de la incertidumbre del patrón [Tabla 149], del sistema instrumental [Tabla 150] y de la muestra [Tabla 151], se calcula la incertidumbre global combinada para cada uno de los HAPs a los dos niveles de trabajo propuestos: nivel bajo (entre 0,01 y 0,1 µg/kg) o a nivel alto (superior a 0,1 e inferior a 10 µg/kg), como la suma cuadrática de cada uno de los componentes.

La incertidumbre expandida ($U_{\text{expandida}}$), se obtiene multiplicando el valor de la incertidumbre combinada por un factor de cobertura de 2 (nivel de confianza del 95%).

En la [Tabla 152], se presenta tanto la incertidumbre combinada como la incertidumbre expandida, para cada uno de los HAPs a los dos niveles de concentración propuestos.

Tabla 152. Incertidumbre global y expandida, para cada uno de los HAP8 a nivel bajo y medio-alto, del procedimiento para la determinación de los HAPs en muestras de leche.

| NIVEL BAJO (entre 0,01 y 0,1 µg/kg) | | | | | |
|--------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Compuesto (PAH8) | $u_{\text{patrón}} (\%)$ | $u_{\text{instrumento}} (\%)$ | $u_{\text{muestra}} (\%)$ | $u_{\text{global}} (\%)$ | $U_{\text{expandida}} (\%)$ |
| BaA | 2,92 | 2,66 | 8,9 | 10 | 19 |
| Cry | 2,92 | 0,65 | 19,7 | 20 | 40 |
| BbF | 2,92 | 0,58 | 11,3 | 12 | 23 |
| BkF | 2,92 | 0,47 | 12,8 | 13 | 26 |
| BaP | 2,92 | 2,31 | 10,7 | 11 | 23 |
| DiBahA | 2,92 | 0,59 | 13,6 | 14 | 28 |
| BghiP | 2,92 | 1,96 | 11,4 | 12 | 24 |
| IP | 2,92 | 16,74 | 13,6 | 22 | 44 |

| NIVEL MEDIO-ALTO (entre 1 y 10 µg/kg) | | | | | |
|----------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Compuesto (PAH8) | $u_{\text{patrón}} (\%)$ | $u_{\text{instrumento}} (\%)$ | $u_{\text{muestra}} (\%)$ | $u_{\text{global}} (\%)$ | $U_{\text{expandida}} (\%)$ |
| BaA | 2,93 | 0,59 | 8,1 | 8,6 | 17 |
| Cry | 2,93 | 1,68 | 8,1 | 8,8 | 18 |
| BbF | 2,93 | 1,62 | 7,0 | 7,7 | 15 |
| BkF | 2,93 | 0,42 | 7,0 | 7,6 | 15 |
| BaP | 2,93 | 0,51 | 6,9 | 7,5 | 15 |
| DiBahA | 2,93 | 2,08 | 6,4 | 7,4 | 15 |
| BghiP | 2,93 | 0,98 | 6,0 | 6,7 | 13 |
| IP | 2,93 | 0,27 | 6,4 | 7,1 | 14 |

Como se puede observar, los valores de incertidumbre obtenidos para cada uno de los HAPs a los dos niveles de concentraciones propuestos cumplen el criterio de aceptación establecido ($u_{\text{global}} < 30\%$).

- **Resumen de los resultados de validación del procedimiento para la determinación de los HAP8 en muestras de leche por UHPLC-FLU**

A partir de los resultados obtenidos en el estudio de validación, se puede concluir que el procedimiento propuesto para la determinación de HAP8 en muestras de leche por UHPLC-FLU:

- Es **selectivo**, ya que no se detectan ni interferencias en los disolventes ni en el material utilizado.
- Es **lineal** en el rango de concentraciones estudiado (1 ng/mL a 1000 ng/mL), aunque para el cálculo de la concentración se propone utilizar dos rectas de calibrado. Una a nivel bajo que incluye patrones de 1 a 10 ng/mL y que se utilizará para cuantificar muestras con concentraciones inferiores o iguales a 0,1 µg/kg. Otra a nivel medio-alto con patrones de 10 a 1000 ng/mL, con la que se cuantifican las muestras que se encuentren en este rango de concentraciones (superiores a 0,1 e inferiores o iguales a 10 µg/kg).
- Tiene una **repetibilidad de inyección**, obtenida con patrones, inferiores al 1% para todos los HAPs a estudio.
- Los **límites de detección y de cuantificación** son inferiores o iguales a 0,004 y 0,01 µg/kg, respectivamente, para los HAP8. Estos límites son suficientes para determinar estos compuestos en muestras de leche, ya que son 100 veces inferiores a los límites legislados en muestras de “leche para lactante o de continuidad” en el Reglamento nº 835/2011.
- Es **exacto y preciso** para los HAP8, ya que se obtienen valores de recuperación superiores al 50% y coeficientes de variación inferiores al 30%. Sin embargo, la recuperación obtenida a concentraciones inferiores a 1 µg/kg es del orden del 85%, por lo que no se considera necesario su corrección. En cambio, las muestras que se encuentran a concentraciones superiores, se corregirán por el 56% si se encuentran a un nivel de 1 µg/kg o del 50% si se encuentran al nivel de 10 µg/kg.
- La **incertidumbre combinada** para cada uno de los HAP8 a los dos niveles de concentración de estudio; nivel bajo ($\leq 0,1$ µg/kg) y nivel medio-alto (entre 1 y 10 µg/kg), son inferiores al 30%. A nivel bajo se obtienen valores entre el 10% y el 22%, mientras que a nivel alto son todos inferiores al 10%.

1.5. ANÁLISIS DE HAP8 EN MUESTRAS DE LECHE CRUDA.

En este campo y con el procedimiento puesto a punto y validado para la determinación de HAP8 en muestras de leche, se han analizado un total de 63 muestras:

- **62 muestras de leche cruda de granja (61 de vaca y 1 de oveja).** Estas leches no han sufrido ningún tipo de transformación ni ningún tratamiento posterior al ordeño del animal. Este tipo de leche no se comercializa a clientes consumidores finales, sólo se distribuyen a terceros para ser sometidas a procesos de transformación o post-tratamiento.

Estas muestras han sido proporcionadas por ALLIC (*Associació Interprofessional Lletera de Catalunya*), procedentes tanto de cisternas como directamente del animal.

- **1 muestra de leche materna humana**

1.5.1. Muestras de leche cruda de granja (vaca y oveja). Disposición, selección, transporte y conservación.

Como se ha comentado, las muestras de leche cruda de granja han sido facilitadas por ALLIC. Actualmente, ALLIC dispone del Laboratorio Oficial de Referencia de Leche cruda y productos lácteos de Catalunya y cuenta con el reconocimiento de todo el sector láctico. Se trata de un laboratorio reconocido y acreditado por la *Direcció General de Producció i Industries Agroalimentàries de la Generalitat de Catalunya*. Además, está acreditado por ENAC según la norma ISO 17025 (nº222/LE472) para realizar todas las analíticas legisladas, sobre este tipo de leches.

ALLIC dispone de leches crudas de dos orígenes: (a) de cisternas de mezcla que cuenta con la mezcla de las leches de las diferentes vacas de una determinada explotación ganadera; (b) leche cruda directamente extraída del animal sin mezclar (leche vaca-vaca).

ALLIC, realiza ensayos tanto de tipo fisicoquímico (contenido de grasa, proteínas, lactosa o el extracto seco magro) como higiénico-sanitarios (determinación de la concentración de células somáticas). Es importante destacar, que entre estos análisis que realiza ALLIC sobre la leche, no se incluye la determinación de los HAPs, por lo tanto, la colaboración IQS-ALLIC ha resultado muy interesante de cara a poder estudiar esta familia de contaminantes orgánicos. Cabe destacar, que los análisis que realiza ALLIC son de tipo destructivo, de manera que el volumen de muestra sobrante después de realizar todas las analíticas es de unos pocos mililitros (aproximadamente 20 mL), que normalmente son desechados.

En lo que hace referencia a la elección de las muestras, ALLIC ha proporcionado las muestras que disponía en un momento determinado en su laboratorio. ALLIC ha proporcionado a IQS el volumen de muestra sobrante de muestras de diferentes explotaciones ganaderas distribuidas por el territorio catalán correspondientes a un periodo de muestreo de 4 días (des del 5/6/2015 al 8/06/2015). Por lo tanto, no será posible valorar la variabilidad estacional de la presencia de HAPs en las muestras y simplemente se podrá valorar la procedencia.

En la [Tabla 153] se muestra la cantidad de muestras asociadas a cada provincia.

Tabla 153. Representatividad de las muestras de leche cruda proporcionadas por ALLIC a IQS

| PROVINCIA | NÚMERO DE EXPLOTACIONES | PROPORCIÓN [%] |
|--------------|-------------------------|----------------|
| Barcelona | 18 | 28,1 |
| Lleida | 14 | 21,9 |
| Girona | 32 | 50,0 |
| Tarragona | 0 | 0,0 |
| TOTAL | 64 | 100,0 |

Las muestras han sido transportadas por personal del IQS en compartimentos refrigerados y aislados físicamente del exterior, en un tiempo inferior a 12 horas. Una vez las muestras han llegado al Laboratorio de Cromatografía del IQS, han sido almacenadas y conservadas en un congelador (-20°C) hasta el momento de su análisis.

1.5.2. Análisis de las muestras. Discusión de los resultados.

Las 63 muestras disponibles se han analizado siguiendo el procedimiento puesto a punto y validado para la determinación de los HAPs (HAP8) en muestras de leche. La descripción completa del procedimiento se incluye en el apartado 1.3. del Capítulo IV de la presente tesis, (página 327).

Como anexo [ANEXO 1], se incluyen los resultados de las 63 muestras de leche analizadas. Se incluye para cada una de las muestras, el contenido de BaP, de HAP4 (Σ BaP, BaA, Cry, BbF) y HAP8 (Σ HAP4, BkF, DiBaH, BghiP e IP).

Es importante tener en cuenta, que la concentración límite para los diferentes HAPs, tal y como se indica en el procedimiento son las siguientes:

- Para el BaP y para todos los HAPs individuales: inferior a 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$.
- Para el grupo de HAP4: inferior a 0,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$.
- Para el grupo de HAP8: inferior a 0,08 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Como se ha comentado, no hay límites legislados para los HAPs en este tipo de muestra pero se dispone de valores límite para el BaP y para los HAP4, tanto en leche de lactantes como en grasas:

- En leche de lactante o leche de continuidad, los valores límite son tanto para el BaP como para los HAP4 de 1 µg/kg.
- En grasas, los valores límite son de 2 µg/kg para el BaP y 10 µg/kg para el grupo de HAP4. Es importante destacar, que en este caso, la concentración de HAPs se debe expresar sobre el contenido de grasa de la leche analizada en cada caso.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se estudian los resultados obtenidos en las muestras de leche analizadas. Debido a que se dispone de 62 muestras de vaca y sólo una de oveja y materna, los resultados se tratan por separado según su origen animal.

- **Leches crudas de vaca.**

Como se ha comentado en la descripción de las muestras, se dispone de 62 leches de vaca que proceden tanto de cisternas (mezcla de todas las vacas de una explotación ganadera determinada) como directamente de cada una de las vacas. En este último caso, debido a la falta de volumen de muestra disponible, ha sido necesario juntar todas las leches de vaca-vaca de una determinada explotación, haciendo que la mezcla sea equivalente a la de la cisterna. Por esta razón, se ha decidido valorar todos los resultados de todas las muestras de leche cruda de vaca disponibles conjuntamente, independientemente de su procedencia (cisterna o vaca-vaca).

El contenido de grasas de todas las leches crudas de vaca analizadas es equivalente y oscila entre el 3,5 y el 5% (p/p). Los valores de cada una de las leches disponibles se incluyen junto al resultado de los HAPs en el anexo.

En la [Tabla 154], se presenta un resumen con el total de muestras de leche cruda analizadas según la provincia a la que pertenecen. Se incluye, en cada caso, el total de muestras de las que se han obtenido resultados positivos para BaP, HAP4 y HAP8, incluyendo los valores máximos. También se realiza una valoración, expresada en porcentaje, de las muestras cuya concentración de HAPs es inferior al límite de cuantificación establecido en el procedimiento.

Tabla 154. Valoración de resultados de muestras de leche cruda de vaca, diferenciadas según provincias. Valoración global del total de las muestras analizadas. Se incluyen las muestras en las que se han obtenido resultados positivos y negativos de este tipo de contaminantes. De las que se tienen resultados positivos, se incluyen los valores máximos.

| Provincia | Nº Total muestras | HAPs NEGATIVO % muestras (nº) | HAPs POSITIVOS (% muestras) | | | µg/kg máximos | | | |
|------------------|-------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----|------|---------------|------|------|------|
| | | | Totales | BaP | HAP4 | HAP8 | BaP | HAP4 | HAP8 |
| Barcelona | 17 | 47% (8) | 53% (9) | 18 | 59 | 47 | 0,03 | 1,2 | 1,2 |
| Lleida | 13 | 53% (7) | 47% (6) | 13 | 22 | 22 | 0,03 | 0,56 | 0,64 |
| Girona | 32 | 38% (12) | 62% (20) | 19 | 41 | 28 | 0,02 | 0,29 | 0,78 |
| Tarragona | 0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| TOTAL | 62 | 44% (27) | 56 % (35) | --- | --- | --- | --- | --- | --- |

Marcado en color naranja, el número de muestras.

Como se puede observar en la [Tabla 154], del total de 62 muestras analizadas, un 44% no han dado resultados positivos de HAPs, es decir, que su concentración es inferior a los límites de cuantificación del procedimiento. Sin embargo, de un 56% de las muestras se han podido reportar resultados de esta familia de contaminantes, es decir, esto supone un total de 35 muestras con resultados positivos de HAPs.

En la [Figura 106] se presentan, en diagramas de barras, los resultados individuales de las muestras correspondientes a Barcelona, Lleida y Girona. Se incluyen los resultados de BaP, HAP4 y HAP8. Cada muestra se identifica con un número correlativo según provincia. Para conocer la relación con su procedencia, se deben tener en cuenta la tabla de resultados que se adjunta en el anexo [ANEXO 1]. En la [Figura 107] se incluye una ampliación de los diagramas de barras presentados donde se incluyen únicamente los resultados del BaP de cada una de las muestras analizadas, también separadas por provincias.

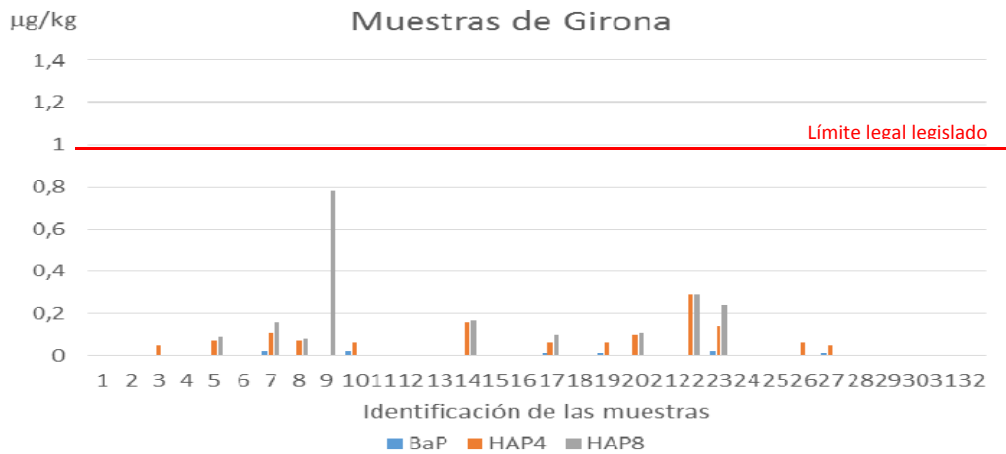
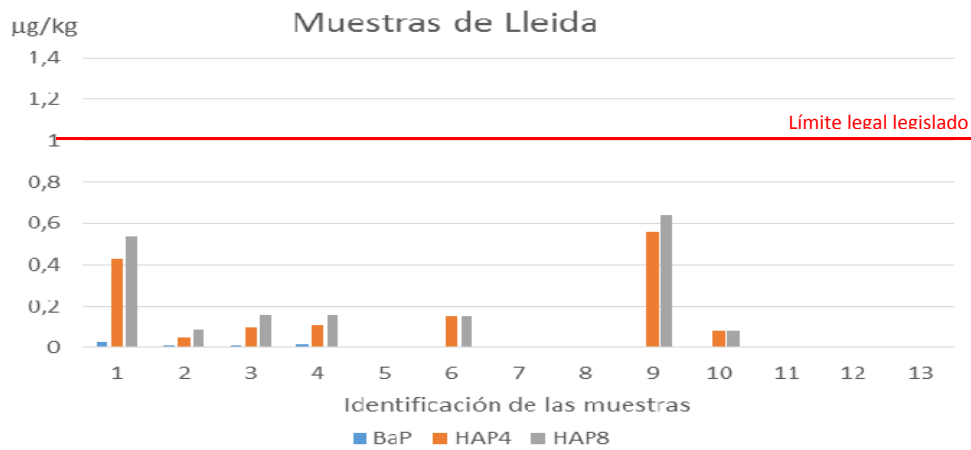
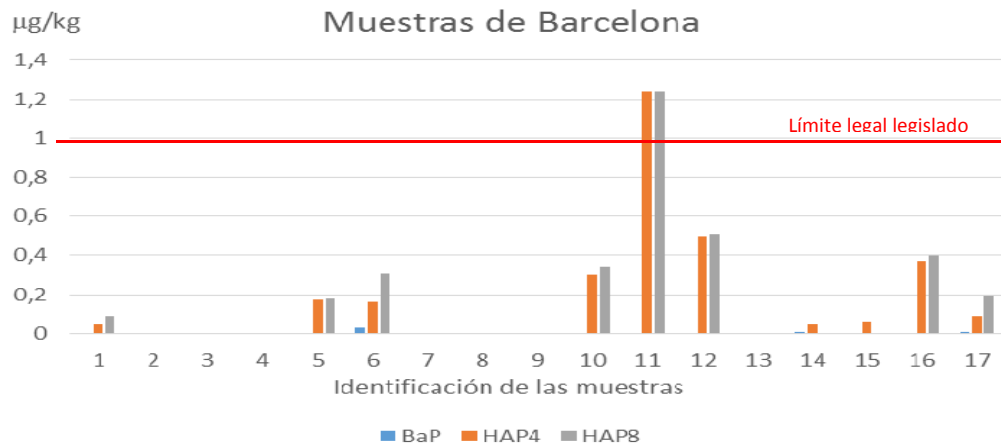


Figura 106. Resultados de BaP, HAP4 y HAP8 de cada una de las muestras de leche cruda de vaca analizadas diferenciada según provincias (Barcelona, Lleida y Girona). Se indica en una línea roja, el límite legal legislado para BaP y HAP4 en leches de lactantes o de continuidad.

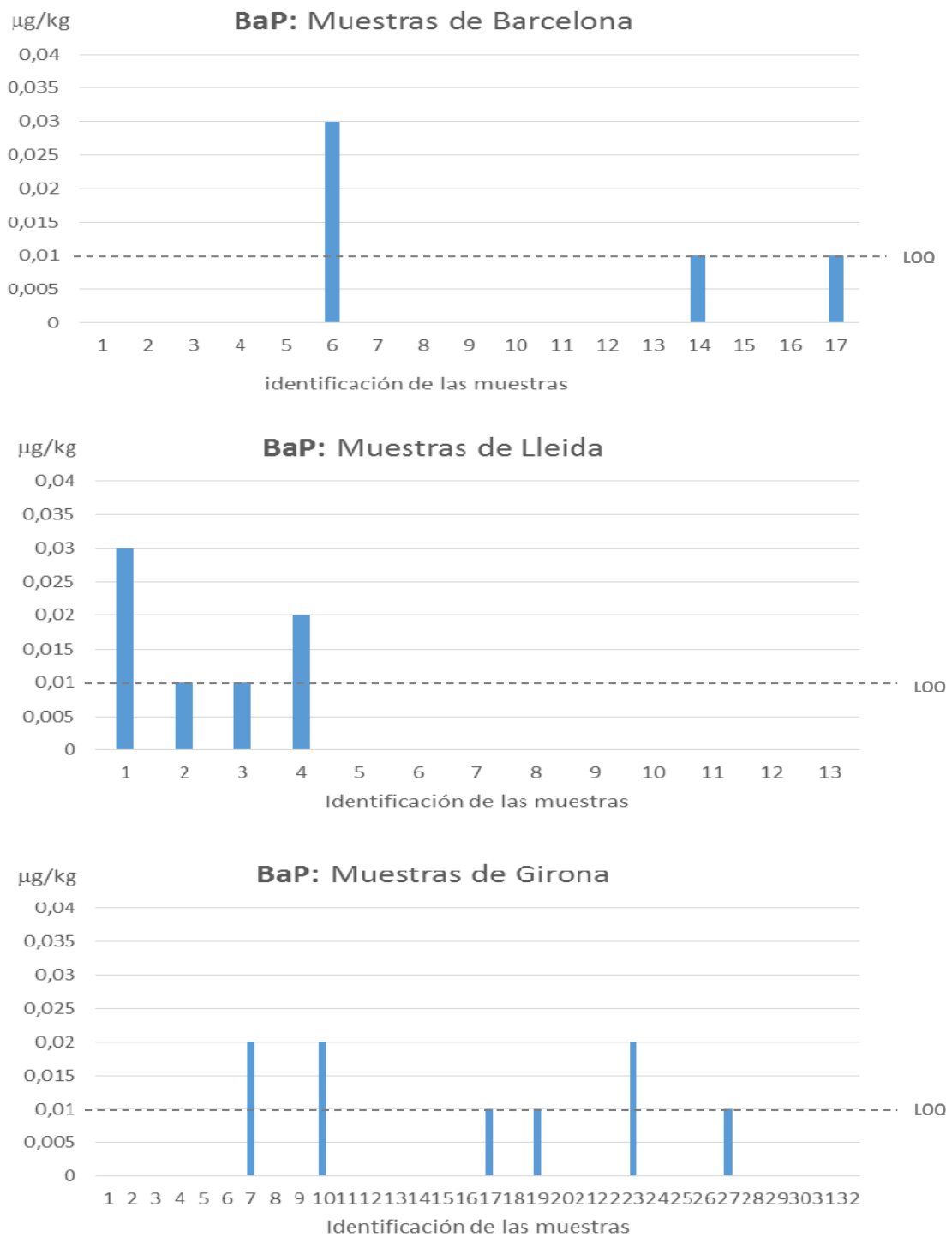


Figura 107. Ampliación de los resultados de BaP de cada una de las muestras de leche cruda de vaca analizadas, diferenciada según provincias (Barcelona, Lleida y Girona). En línea gris, se indica el LOQ del procedimiento.

Del total de 35 muestras en las que se ha podido determinar la concentración de HAPs (BaP, HAP4 o HAP8) se puede decir que:

- Los valores máximos de BaP son del orden de 0,03 µg/kg (en muestras de Barcelona y Lleida), por lo tanto, en todas las muestras analizadas el contenido de este compuesto es claramente inferior a 1 µg/kg (valor legislado en muestras de leche de lactantes o leche de continuidad).
- Para el grupo de HAP4 y HAP8, los resultados más tienen un contenido de HAP4 (y HAP8) de 1,24 µg/kg, pero en cambio tiene un contenido de BaP inferior a 0,01 µg/kg. Si se tienen en cuenta los valores legislados para HAP4 en leche de lactante (HAP4 inferior 1 µg/kg), esta es la única muestra que no se encontraría dentro de los límites establecidos.

Si se observa la [Figura 106], y se comparan los resultados de HAP4 y HAP8 de las diferentes muestras, se observa que en la mayoría de los casos ambas concentraciones son muy parecidas. En la [Tabla 155], se presenta una clasificación de las muestras (sin distinción provincial), según la proporción que representa el grupo de HAP4 respecto a los HAP8, expresado tanto en número de muestras como en porcentaje. Así, las muestras las podemos dividir en tres grupos, las que tienen una proporción de HAP4/HAP8 superior al 75%, las que se encuentran entre el 75 y el 25%, y las muestras que la proporción de HAP4/HAP8 es inferior al 25%.

Tabla 155. Resultados de las muestras de leche cruda de vaca analizadas: clasificación de las muestras en función de la relación HAP4/HAP8.

| | Relación HAP4/HAP8 | | | Muestras totales |
|-------------------------------------------------|--------------------|-----------------|-----------------|---------------------|
| | Superior al 75% | Entre 75% y 25% | Inferior al 25% | |
| Número de muestras | 17 | 9 | 1 | 27 |
| Porcentaje (%) en número de muestras | 63% | 33% | 4% | 100% |

Como se puede observar, en un 63% de las muestras (17) es suficiente con incluir los HAP4 (BaA, Cry, BbF y BaP) para poder describir adecuadamente esta familia de contaminantes en muestras de leche. Sin embargo, en un 33% de las muestras (9) es necesario complementar la información de los HAPs con el contenido de BkF, DiBahA, BghiP e IP. En cambio, sólo en una muestra que ha dado positivo en HAPs no tiene HAP4 y sólo tiene BkF, DiBahA, BghiP e IP, por lo que se considera un caso aislado y no se tiene en consideración.

Por lo tanto, queda claro que la descripción de los HAPs en las muestras no se puede centrar sólo en el BaP. Pero en la mayoría de los casos, un sistema de HAP4 es suficiente para la descripción de esta familia de contaminantes en muestras de leche.

A parte de los resultados globales de HAP4 y HAP8, y de la concentración individual de BaP (como máximo indicador de toxicidad), es también interesante estudiar el porcentaje que representa cada uno de los compuestos individuales (BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP e IP) en el total de HAPs. La distribución de los HAPs suele dar idea de la procedencia o su posible

fuelle de contaminación y, en este caso, también puede indicar cuales son los HAPs que han estado metabolizados por el animal. Es importante destacar, que en este caso se supone que la contaminación de la leche con este tipo de compuestos orgánicos, proviene mayoritariamente de una contaminación ambiental.

En la [Figura 108], [Figura 109] y [Figura 110], se presentan en diagramas circulares el porcentaje de cada uno de los HAPs en las muestras de leche cruda de vaca con resultados positivos de HAPs en Barcelona, Lleida y Girona, respectivamente.

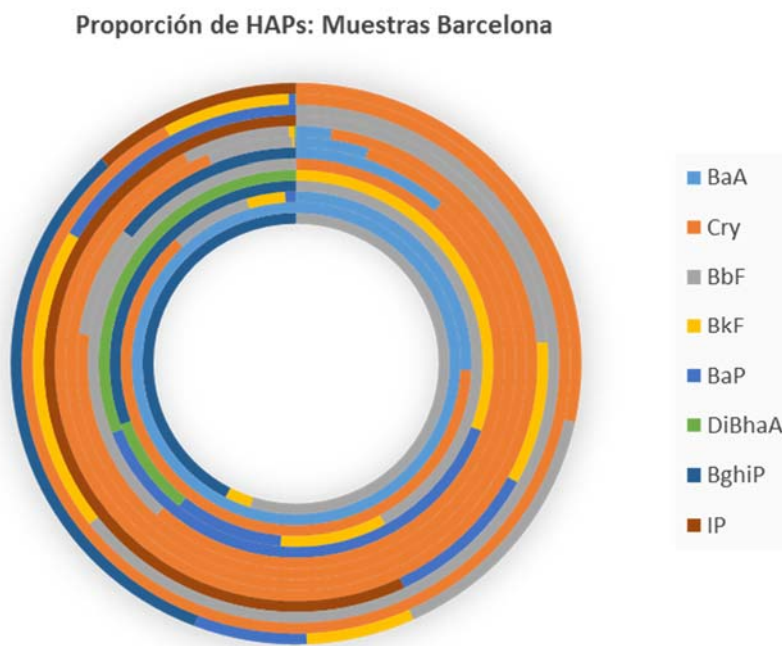


Figura 108. Porcentaje de cada uno de los HAPs, de forma individual, en las diferentes muestras de leche cruda de vaca procedentes de explotaciones ganaderas de la comarca de Barcelona.

Proporción de HAPs: Muestras de Lleida

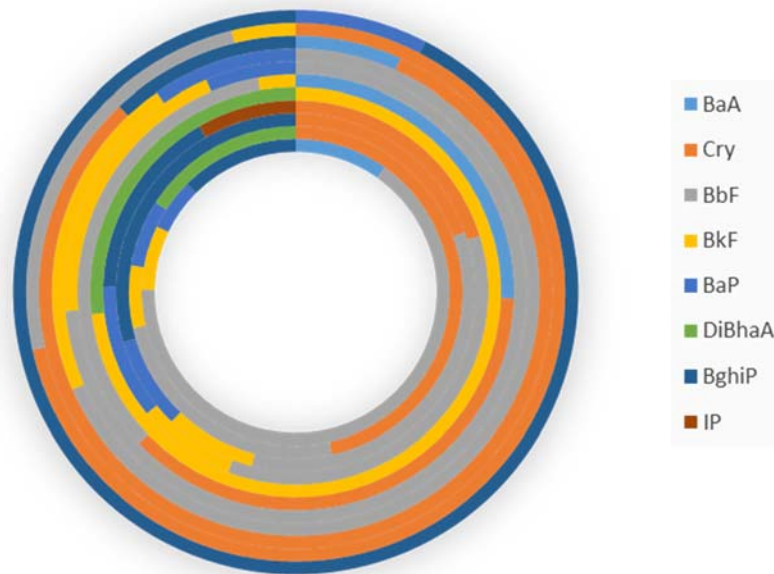


Figura 109. Porcentaje de cada uno de los HAPs, de forma individual, en las diferentes muestras de leche cruda de vaca procedentes de explotaciones ganaderas de la comarca de Lleida.

Proporción de HAPs: Muestras de Girona

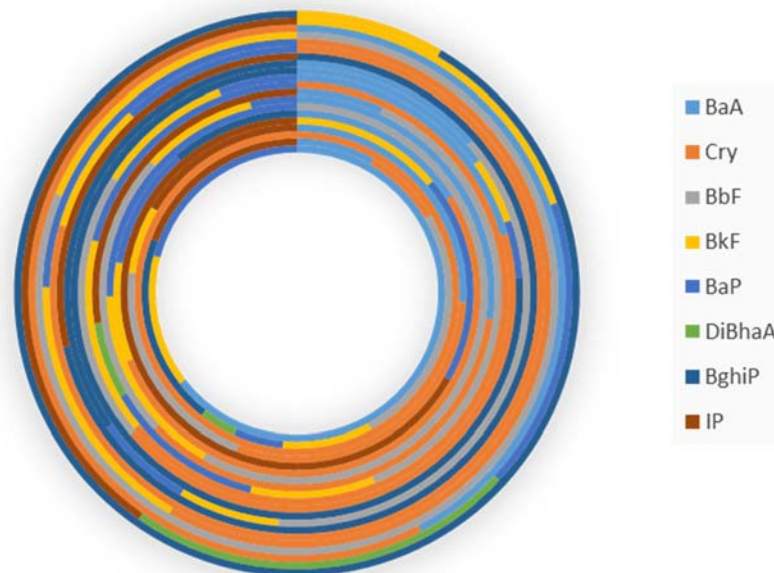


Figura 110. Porcentaje de cada uno de los HAPs, de forma individual, en las diferentes muestras de leche cruda de vaca procedentes de explotaciones ganaderas de la comarca de Girona.

Como se puede observar en los gráficos de distribución individual de los HAPs en las muestras de leche analizadas, no existe una distribución única y clara que haga pensar en una misma fuente emisora.

En la mayoría de los casos, el criseno, el benzo(b)fluoranteno y el benzo(ghi)perileno son los compuestos más abundantes. En el caso de los compuestos que se encuentran en menor proporción, no es posible sacar conclusiones porque existe demasiada variabilidad en función del tipo de muestra. Además, es importante tener en cuenta que el porcentaje que representa el BaP respecto al total de HAP8 suele ser bajo, normalmente se encuentra entre el 10-20%, a excepción de en una muestra de Barcelona que llega a un máximo del 38%.

- **Leches crudas de oveja y materna**

En este caso, sólo se dispone de una muestra de leche de oveja y otra materna, por lo tanto, no es posible sacar conclusiones comparativas entre diferentes orígenes de leche.

En la [Tabla 156], se presentan los resultados obtenidos de BaP, HAP4 y HAP8 de las dos muestras de leche disponibles, tanto de oveja como materna.

Tabla 156. Resultados de las muestras de leche cruda de oveja de leche materna. Resultados de BaP, HAP4 y HAP8 en µg/kg.

| Tipo de leche | Provincia | µg/kg | | |
|--------------------|-----------|--------|------|------|
| | | BaP | HAP4 | HAP8 |
| OVEJA | Barcelona | < 0,01 | 0,09 | 0,12 |
| MATERNA (*) | Lleida | < 0,01 | 0,31 | 0,36 |

(*) Madre no fumadora, cuarto mes de lactancia

Como se puede observar, en ninguna de las dos muestras se puede determinar la concentración de BaP, ya que se encuentra por debajo del límite de cuantificación del procedimiento. En el caso de los HAP4 y HAP8 parece que la leche de oveja analizada tiene un contenido de HAPs bajo, mientras que la leche materna tiene un contenido más comparable con las leches de vaca analizadas. Además, si se tiene en cuenta la relación HAP4/HAP8, se puede decir que en ambos casos los HAP4 son igual o superior al 75% del total de HAPs detectados.

En la [Tabla 157], se presenta la proporción de cada uno de los HAPs en las dos muestras analizadas.

Tabla 157. Porcentajes individuales de cada uno de los HAPs en las muestras de oveja y materna analizadas.

| Compuesto HAP | OVEJA | MATERNA |
|------------------|----------------------------------------|---------|
| | HAP _i /HAP ₈ (%) | |
| BaA | < 0,5 | < 0,5 |
| Cry | < 0,5 | 37 |
| BbF | 45 | 45 |
| BkF | 11 | 4 |
| BaP | 15 | 3 |
| DiBahA | < 0,5 | 2 |
| BghiP | < 0,5 | < 0,5 |
| IP | 29 | 9 |

En ambos casos, el compuesto más abundante es el benzo(b)fluoranteno y en ninguno de los dos casos se detecta ni BaA, ni BghiP y el BaP se encuentra a un nivel bajo (15% en leche de oveja y 3% en leche materna).

1.5.3. Estudio del pico interferente.

Durante el desarrollo del procedimiento de preparación de muestra y en el análisis de alguna de las muestras, se ha observado la presencia de un *pico interferente* que aparece en algunos de los cromatogramas a un tiempo de retención de 4,2 min. Este pico aparece tanto a las longitudes de onda 296/405, donde se detectan 7 de los 8 HAPs a estudio, como a 318/510, donde se detecta el IP. [Figura 111]

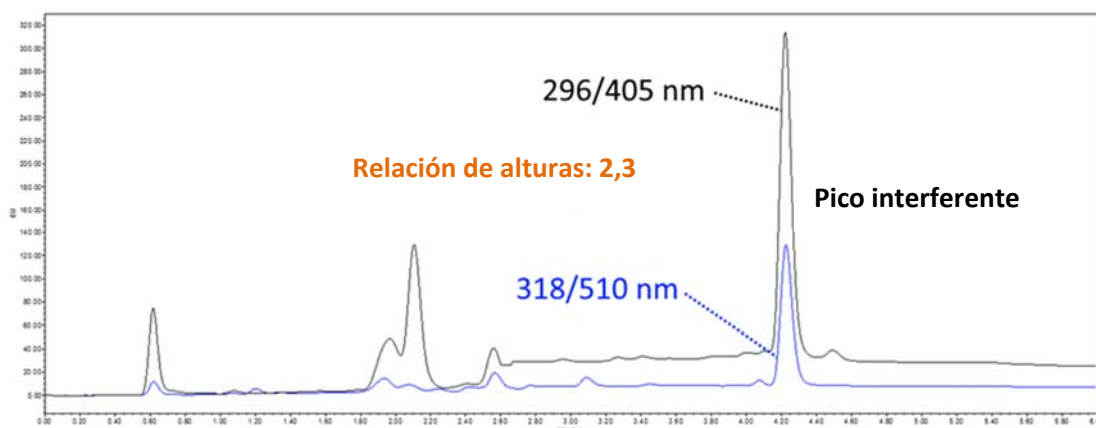


Figura 111. Pico interferente, detección en los dos canales fluorescencia del procedimiento para la determinación de HAP8 en muestras de leche.

El *pico interferente* se eluye al mismo tiempo de retención que el pico de DiBahA, dando lugar a un solapamiento total o parcial impidiendo, en alguno de los casos, la cuantificación de este compuesto. El *pico interferente* presenta una intensidad variable en las diferentes muestras en las que se ha detectado, oscilando entre 4 y 500 EU (unidades de emisión). Si se cuantifica con el factor de respuesta del DiBahA, se obtiene una concentración en disolución comprendida entre 1 y 500 ng/mL. Teniendo en cuenta el proceso de preparación de la muestra, la concentración de este pico estaría a un nivel de entre 0,01 y 5 µg/kg.

La primera vez que aparece este pico es durante el desarrollo del diseño de experiencias, y en ese momento se atribuyó a un pico desconocido que dependía de las condiciones de trabajo. Cuando se llevó a cabo la validación del procedimiento, no se detectó la presencia de este *pico interferente*, ni en el blanco de proceso, ni en las muestras, ni en las muestras adicionadas. Por lo tanto, se pensó que el problema había sido puntual. Cuando se analizan las primeras muestras, tampoco se detecta el *pico interferente*, pero a medida que se iban analizando muestras, este pico aparecía de forma aleatoria y con una intensidad variable.

Por esta razón, se decide realizar un estudio exhaustivo para conocer cuál es el origen del *pico interferente* y, si es posible, llevar a cabo su identificación.

Se plantean varias hipótesis sobre la procedencia del *pico interferente*:

- *Hipótesis 1*: es un producto de reacción de alguno de los HAPs, formado durante el proceso de saponificación.
- *Hipótesis 2*: proviene de la muestra o se forma durante el proceso de saponificación a partir de alguno de los componentes de la muestra.
- *Hipótesis 3*: es una contaminación del sistema cromatográfico.
- *Hipótesis 4*: proviene de una contaminación del material o de los reactivos utilizados.

A continuación, se estudian cada una de las hipótesis planteadas con la finalidad de poder conocer la procedencia del *pico interferente*.

2.5.3.1 Estudio de la procedencia del *pico interferente*.

Se estudian las hipótesis planteadas sobre la posible procedencia del *pico interferente*.

- **Hipótesis 1: el *pico interferente* es un producto de la reacción de alguno de los HAPs, formado durante el proceso de saponificación.**

El hecho de que el *pico interferente* se eluya en la zona del cromatograma donde se detectan los HAPs pesados y absorba a sus longitudes de onda características, hace pensar en la posibilidad,

que forme parte de la familia de los HAPs, o bien, pueda ser un derivado o un producto de degradación, con una base estructural equivalente.

Para poder determinar si el *pico interferente* corresponde al producto de alguno de los HAPs durante el proceso de saponificación, se realiza una preparación de muestra, adicionando una cantidad de HAPs muy superior a la que es de esperar que haya en la leche. Con la muestra adicionada a nivel alto, se procede a realizar el procedimiento de preparación de la muestra, tal y como se describe en el apartado 1.3. del Capítulo IV de la presente tesis (Página 327). La adición realizada corresponde a 200 µL de un patrón conjunto de los 16 EPA-HAPs de 100 ng/mL sobre 2,5 mL de muestra de leche (unos 8 µg/kg). El extracto, en este caso, se reconstituye con 1 mL de acetonitrilo, por lo tanto, la concentración de HAPs en la disolución inyectada es de unos 20 ng/mL.

En los cromatogramas obtenidos, no se detecta la presencia del *pico interferente* a 4,2 min. Por lo tanto, se puede descartar la posibilidad de que el *pico interferente* sea un producto de la degradación de los mismos 16 EPA-HAPS en la etapa de saponificación.

- **Hipótesis 2: el *pico interferente* proviene de la muestra y se forma durante el proceso de saponificación a partir de alguno de los componentes de sus componentes.**

Con el objetivo de comprobar esta hipótesis, se propone realizar seis preparaciones independientes de una muestra de la que se ha comprobado, previamente, que da un resultado positivo para el *pico interferente*. Si se obtienen resultados comparables en las seis muestras preparadas, se podría decir, que este pico proviene de la muestra, es decir, está en ella o es un producto de degradación de alguno de sus componentes durante el proceso de saponificación.

En la [Tabla 158], se presentan los resultados individuales correspondientes al *pico interferente* expresados en concentración en disolución (ng/mL), calculados con el factor de respuesta del DiBahA, en las seis preparaciones de muestra realizadas.

Tabla 158. Concentración del pico interferente obtenida al realizar 6 preparaciones de una misma muestra de leche con un resultado positivo de pico interferente. Calculada con el factor de respuesta del DiBahA.

| Replicado muestra | Concentración <i>pico interferente</i> (ng/mL) (*) |
|-------------------|----------------------------------------------------|
| 1 | < 0,1 |
| 2 | 1,4 |
| 3 | 6,3 |
| 4 | < 0,1 |
| 5 | 0,5 |
| 6 | 0,6 |

(*) En este caso, se fija como límite de detección 0,1 ng/mL

Como se puede observar en la [Tabla 158], los resultados del *pico interferente* de los seis replicados de muestra son muy diferentes entre sí. Incluso en dos de las muestras preparadas no se detecta. De esta manera, se descarta la posibilidad de que el *pico interferente* provenga de la misma muestra.

Se podría llegar a pensar que el *pico interferente* no se forma en el proceso de saponificación sino que se destruye, y que en realidad, está presente inicialmente en la muestra. Para descartar esta posibilidad, se decide realizar tres extracciones líquido-líquido con 10 mL de hexano directamente sobre la muestra, sin realizar la etapa previa de saponificación. El extracto obtenido se seca con sulfato de sodio anhidrido, se concentra y se reconstituye con acetonitrilo para poder ser analizado por UHPL-FLU, con el mismo método cromatográfico con el que se determinan los HAP8.

En la [Figura 112], se presenta la superposición de los cromatogramas obtenidos. Como se observa, sólo en una de las repeticiones realizadas aparece el *pico interferente*. Por lo tanto, se confirma que el tratamiento de saponificación no es el responsable de la aparición del *pico interferente* y, además, no proviene de la muestra.

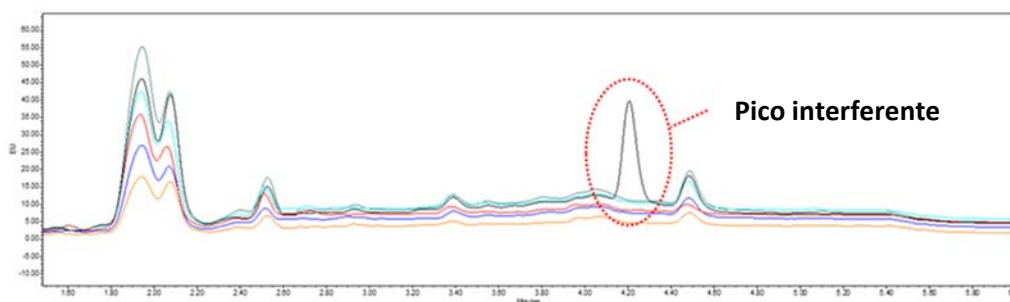


Figura 112. Cromatogramas (296/405) obtenidos al inyectar 6 extractos resultantes de la extracción líquido-líquido con hexano de una muestra de leche que había dado resultado positivo del *pico interferente*. En este caso, este *pico* se eluye a 4,2 min.

- **Hipótesis 3: el *pico interferente* proviene de una contaminación del sistema cromatográfico.**

Generalmente, un problema de contaminación del sistema cromatográfico se detecta ya que la contaminación se hace más o menos evidente a medida que la secuencia avanza. Además, si se tiene un buen diseño de secuencia, y se intercalan inyecciones de blanco de disolvente, éstos deberían estar cada vez más o menos contaminados.

En este caso, el *pico interferente* aparece de forma aleatoria en los cromatogramas de las muestras pero nunca se detecta ni en los blancos de disolvente, ni en los patrones inyectados en la misma serie de inyecciones. Por lo tanto, esta hipótesis queda descartada.

- **Hipótesis 4: el *pico interferente* proviene de una contaminación del material utilizado.**

En este apartado, se consideran las posibles contaminaciones que tienen su origen en el material utilizado en alguno de los puntos del procedimiento de preparación de la muestra.

Se consideran 7 posibles puntos de contaminación del material utilizado en el procedimiento de preparación:

- a) **Erlenmeyer** de vidrio de 250 mL donde se realiza la saponificación de las muestras.
- b) **Tapones de vidrio esmerilado** (utilizados en la validación) **o de silicona** (utilizados durante el análisis de las muestras).
- c) **Pipetas pasteur.**
- d) **Viales del tipo “tubo clic”** de 30 mL con **tapones de naturaleza plástica**, donde se trasvasa el extracto orgánico resultante de la extracción líquido-líquido, para secarlo con sulfato de sodio.
- e) **Embudos de vidrio** donde se coloca el papel de filtro para filtrar el extracto seco antes de ser concentrado.
- f) **Tubos de vidrio cónico graduados** de unos 10 mL donde se concentra el extracto orgánico, para que una vez concentrado se reconstituya con 100 µL de acetonitrilo.
- g) **Viales y microinsertos de vidrio** desactivado con **tapón y septum de silicona/PTFE pre-perforado** transparente de la casa comercial *Waters* (referencia: 600000668CV), para la inyección de los extractos por UHPLC-FLU.

Para realizar el estudio del origen del *pico interferente*, primero se mantiene la hipótesis que el material de un solo uso es el que tiene menos probabilidad de ser el agente contaminante. Así, en un principio no se consideran ni las pipetas *pasteur*, ni los viales tubo *clic*, ni los viales de inyección. Se centra el estudio en el material de vidrio re-utilizable.

Estudio de las posibles fuentes de contaminación.

- **Material de vidrio reutilizables: erlenmeyers, embudos de vidrio y tubos de vidrio cónico graduados.**

Para estudiar si la fuente de contaminación procede de los erlenmeyers (inicio del proceso de preparación de muestra) o de los embudos de vidrio (final del proceso), se decide reproducir el procedimiento con 6 blancos de proceso. Para ello, se toman 10 mL de agua MilliQ y se introducen en un erlenmeyer de 250 mL de vidrio. Se le añaden los 30 mL de KOH (metanólica) y se tapan con tapones de vidrio esmerilado. Se introducen en el horno a 80°C durante 2 horas. Posteriormente, se añaden 30 mL de agua MilliQ y se realizan las tres extracciones líquido-líquido con 10 mL de hexano cada una. No se observa dificultad de separación de fases, en ninguno de los casos. La fase orgánica se introduce en los viales tubo *clic* donde se añade sulfato de sodio anhídrido para secar el extracto. No es necesaria

una agitación vigorosa porque el sulfato de sodio sedimenta fácilmente. A continuación, en la etapa de filtración, se utilizan embudos. La fase orgánica filtrada se concentra con corriente de nitrógeno en los tubos de vidrio cónicos graduados hasta llegar a sequedad. Se reconstituyen con 100 μ L de ACN y se introduce en los viales de inyector automático para inyectarlos por UHPLC-FLU con el método cromatográfico propuesto.

Se observa que en ninguna de las seis repeticiones de los blancos preparados aparece el *pico interferente* [Figura 113].

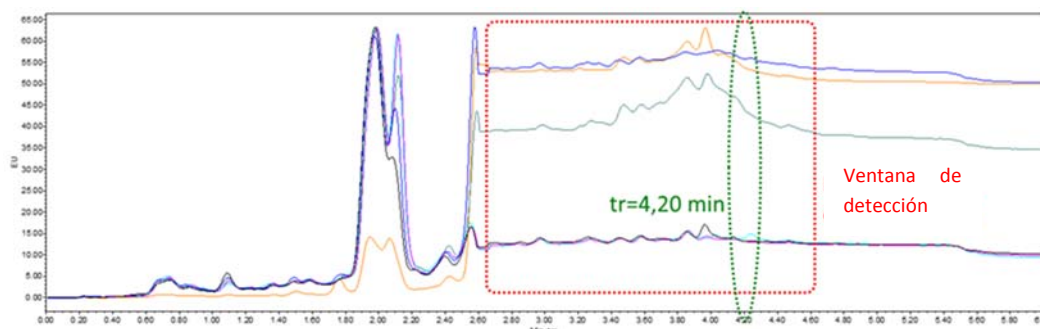


Figura 113. Superposición de los 6 cromatogramas obtenidos al analizar por UHPLC-FLU los extractos de los blancos de proceso realizados [longitudes de onda: 296/405].

Así, se descartan tanto los erlenmeyers, como los embudos utilizados para la filtración como posibles fuentes de contaminación. En principio, también se debería descartar también todo el material, disolventes y reactivos utilizados en el procedimiento.

Aun así, para poder asegurar que los tubos cónicos graduados no son la fuente de contaminación, se decide introducir 10 mL de hexano en uno de los tubos cónicos disponibles, previamente limpio. Estos mismos 10 mL se pasan por los otros 5 tubos cónicos disponibles y en el último de ellos, se procede a concentrar el disolvente a sequedad. Posteriormente, se añaden 100 μ L de acetonitrilo que se inyecta por UHPLC-FLU. Como no se detecta la presencia del *pico interferente* en el extracto obtenido, se descartan también los tubos cónicos como posible fuente de contaminación.

- *Tapones de los Erlenmeyer.*

Durante la etapa de saponificación es necesario tapar los erlenmeyers. Durante el estudio se ha trabajado con dos tipos de tapones: tapones de vidrio esmerilado y séptums de goma. Los tapones de vidrio se descartan como fuente de contaminación, ya que en el estudio de los blancos se han utilizado este tipo de tapones.

Con la finalidad de comprobar si los séptums de goma son los responsables de la contaminación, se realizan dos tipos de ensayos:

Primer ensayo: Los séptums utilizados en el proceso, aparentemente limpios, se irradian con luz de una longitud de onda de 360 nm (luz ultravioleta cercana a la que absorbe el *pico interferente*). Se observa que los séptums emiten una ligera

coloración roja, especialmente en su zona central, que entra en contacto con la muestra cuando se tapa el erlenmeyer. Paralelamente, se realiza el mismo ensayo, tanto con séptums de goma nuevos como con los tapones de vidrio. Se observa que, como era de esperar, los tapones de vidrio no emiten coloración (por lo tanto se pueden considerar blancos), mientras que los séptums de goma nuevos también emiten coloración rojiza cuando se irradian con una luz de longitud de onda de 360 nm. Este hecho, puede indicar que los séptums de goma contienen compuestos fluorescentes en su composición, aunque no se puede asegurar que corresponda al *pico interferente*. Para comprobarlo, se lleva a cabo el segundo de los ensayos.

Paralelamente, se decide establecer contacto con la empresa proveedora de los séptums de goma para obtener más información sobre su composición, pero no se consigue conocer exactamente.

Segundo ensayo: para comprobar si el compuesto/s fluorescentes que se encuentran presentes en el septum de goma son los responsables del *pico interferente*, se decide llenar un vaso de precipitados de 500 mL con los séptums de goma disponibles. Se añade suficiente potasa metanólica en exceso, para conseguir cubrir totalmente los tapones. Se introduce un termómetro en el vaso para controlar la temperatura y evitar la ebullición del disolvente y se calienta durante dos horas en una placa calefactora, dentro de una campana de extracción. Después del calentamiento, se separa el líquido por decantación y se realizan tres extracciones con unos 10 mL de hexano. Finalmente, el extracto seco, se concentra hasta sequedad y se reconstituye con 100 µL de acetonitrilo. El extracto se inyecta por UHPLC-FLU [Figura 114].

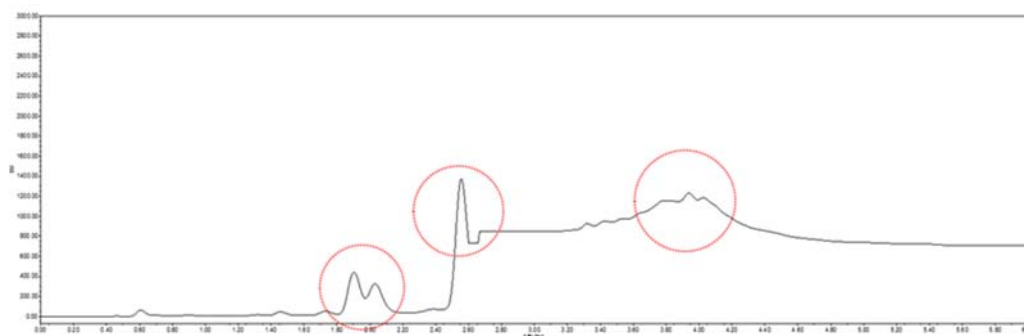


Figura 114. Cromatograma obtenido al analizar por UHPLC-FLU (296/405) el extracto de los séptums de goma.

A pesar que en el cromatograma obtenido se detectan varios picos y un aumento de la línea de base, ninguno de ellos coincide con el *pico interferente*. Sin embargo, gracias a este ensayo, se obtiene un perfil de la línea de base de las muestras que se han analizado utilizando este tipo de tapones.

Después de este estudio, los tapones tanto de vidrio como de goma quedan descartados como posible fuente de contaminación.

- *Viales y microinsertos de vidrio desactivado con tapón y septum de silicona/PTFE pre-perforado para inyector automático.*

Para comprobar si los viales y los séptums de inyección pueden ser los responsables del origen del *pico interferente* se decide llenar con acetonitrilo (disolvente de patrones y muestras) cinco viales de inyector automático nuevos. Se tapan con el tapón y el septum pre-perforado y se inyectan por UHPLC-FLU con el método cromatográfico propuesto. Una vez inyectados los cinco viales y comprobado que no aparece el *pico interferente*, los mismos viales se invierten durante 30 minutos, dejando en contacto el disolvente con el septum perforado, favoreciendo la disolución de los compuestos procedentes del septum del vial de inyección. Pasados estos 30 minutos, se inyectan nuevamente los mismos cinco viales. En ninguno de ellos se detecta la presencia del *pico interferente*, descartándolos como posible fuente de contaminación.

- *Viales de vidrio tipo “tubo clic” y sus tapones de plástico.*

Los viales tubo *clic* son los recipientes donde se seca el extracto orgánico después de la extracción líquido-líquido. Así, el vial con el extracto orgánico con sulfato de sodio, se cierra con el tapón de plástico y se agita hasta que el extracto orgánico queda seco. Los viales son de vidrio y de un solo uso, por lo tanto, su contaminación parece poco probable. Sin embargo, la contaminación puede provenir de los tapones de plástico. El extracto orgánico entra en contacto con ellos cuando se produce la agitación, y será más importante cuanto más vigorosa sea. Las muestras se agitan más o menor en función del tiempo que le cueste al sulfato de sodio capturar el agua del extracto, por lo tanto, puede ser muy variable.

Para poder estudiar si el *pico interferente* proviene de los tapones de los viales tubo *clic*, se decide introducir seis tapones en un vaso de precipitados con hexano suficiente como para que queden totalmente sumergidos. Los tapones, se mantienen en contacto con el disolvente durante 30 minutos, a temperatura ambiente y sin agitación. Transcurrido este tiempo, el disolvente se decanta, se lleva a sequedad y se reconstituye con 100 μ L de acetonitrilo. Este extracto se inyecta por UHPLC-FLU con el método cromatográfico propuesto. Los resultados obtenidos se presentan en la [Figura 115].

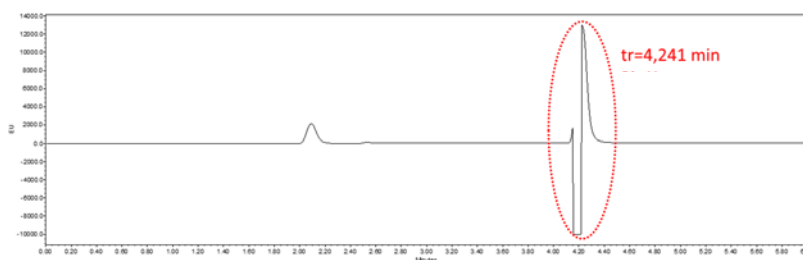


Figura 115. Cromatograma obtenido al analizar por UHPLC-FLU (296/405) el extracto correspondiente a los tapones de los tubos clic.

Como se puede observar, se detecta un pico saturado al tiempo de retención correspondiente al *pico interferente*. De manera que queda claro que el origen de la contaminación del *pico interferente* procede de los tapones de los viales tubo clic.

A pesar de que los resultados obtenidos parecen concluyentes, es importante plantearse por qué los blancos y algunas de las muestras no generan el *pico interferente*, si en todos los casos se realiza la etapa de secado del extracto en los viales tubo clic.

Se encuentran dos posibles justificaciones:

- Que los tapones no contengan siempre la misma cantidad del *pico interferente*, de manera que el contenido extraído sea variable. Esta explicación parece poco probable si forma/n parte de la formulación del tapón.
- Que en los blancos, el extracto de sulfato de sodio prácticamente no se haya agitado y que en las muestras la agitación haya sido más variable tanto en tiempo como en intensidad, provocando que la extracción del *pico interferente* del tapón puede ser muy variable.

Una vez conocido el origen del *pico interferente*, se evitarán las interferencias cambiando el tipo de vial (o tapón) utilizado para realizar el secado del extracto orgánico y comprobando que el nuevo modelo no introduce interferencias.

2.5.3.2 Caracterización y elucidación estructural del compuesto/s que genera el *pico interferente*.

Se procede a intentar elucidar su estructura. Como punto de partida se sabe que:

- Es un compuesto que en las condiciones cromatográficas de trabajo, se eluye con un tiempo de retención de 4,2 min, entre el pico de BaP y DiBaH_A, en la zona de máximo poder eluotrópico.
- Es un compuesto con características fluorescentes que da señal a los dos canales de detección escogidos (296/405 y 318/510). Esto hace pensar, en que su estructura presenta aromaticidad y deslocalización electrónica.

Los espectros y las técnicas que se han utilizado para intentar elucidar la estructura del *pico interferente*, son las siguientes:

- Espectro de ultravioleta
- Espectros de fluorescencia (excitación y emisión)
- Espectro de masas obtenido por HRGC-MS con ionización por impacto electrónico.
- Espectro de masa obtenido por UHPLC-MS, utilizando el electrospray como fuente de ionización

Para ello, se decide analizar tanto un extracto de leche que presenta el *pico interferente* como el obtenido con los taponos de los viales tubo *clic*, que está muy concentrado en este compuesto/s, utilizando las diferentes técnicas.

- **Espectro de ultravioleta.**

El *pico interferente* se trata de un compuesto que da poca señal en el detector de UV, si se fija la longitud de onda de absorción a 254 nm. A pesar de ello, se consigue extraer el espectro de absorción del compuesto/s a estudio ya que se trabaja con un detector de *Diode Array*. (Rango de longitudes de onda propuesto: 195 a 600 nm). En este caso, como la separación se realiza por UHPLC, el pico sobre el que se ha extraído el espectro de UV es el que se eluye a los 4,2 min. [Figura 116]

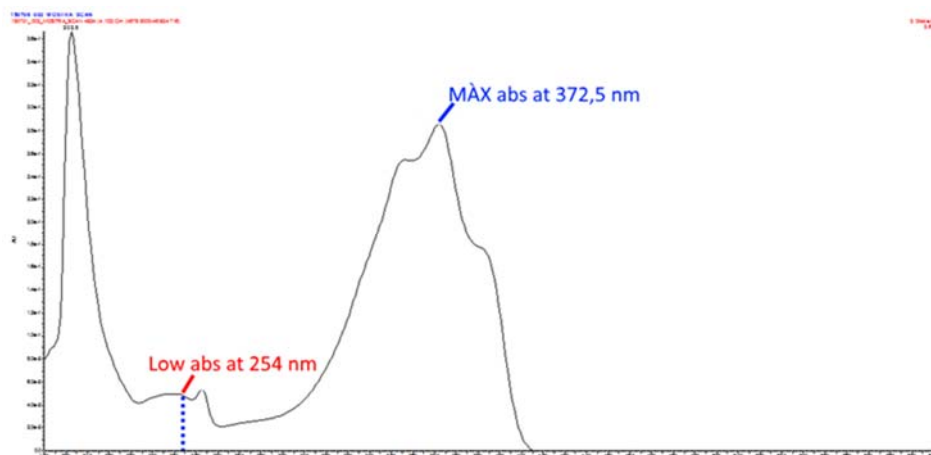


Figura 116. Espectro de UV del pico interferente obtenido previo análisis del extracto por UHPLC-DAD.

El compuesto presenta un máximo de absorción a 372,5 nm y un mínimo relativo a 254 nm.

Aunque la comparación de los espectros de UV es una estrategia poco eficaz ya que los espectros de UV no suelen ser suficientemente característicos para poder identificar, se decide realizar una comparación manual en la base de datos del programa informático *PhotochemCAD*, disponible con licencia libre. El espectro del *pico interferente* tiene un perfil muy parecido con el del compuesto conocido con el nombre POPOP (1,4-bis(5-feniloxazol-2-il)benceno) [Figura 117], aunque el máximo absoluto está desplazado unos 20 nm.

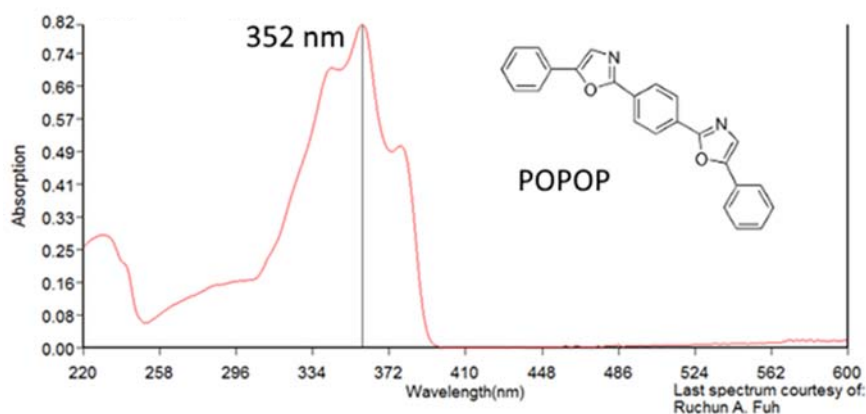


Figura 117. Espectro de UV del compuesto POPOP (obtenido del programa informático PhotochemCAD).

• **Espectro de fluorescencia.**

En la [Figura 118], se presentan los espectros de excitación y emisión, obtenidos al analizar por UHPLC-FLU el extracto correspondiente a los tapones de los viales tubo *clic*, que se encuentra muy concentrado en el *pico interferente*. El estudio de los espectros de excitación y emisión, se realiza aprovechando la función que incluye el software de *Empower*. Para ellos, se fija una longitud de onda de excitación (295 nm) y se realiza un barrido de emisión en el rango de longitudes de onda entre 390 y 550 nm. Posteriormente, se vuelve a analizar pero fijando la longitud de onda de emisión (405 nm) y se hace un barrido de longitudes de onda de excitación (de 200 a 400 nm). De esta manera, se obtienen los diagramas de iso-excitación e iso-emisión a lo largo de todo el cromatograma y se extrae de la señal obtenida a 4,2 min, su espectro de excitación y emisión, en cada uno de los casos.

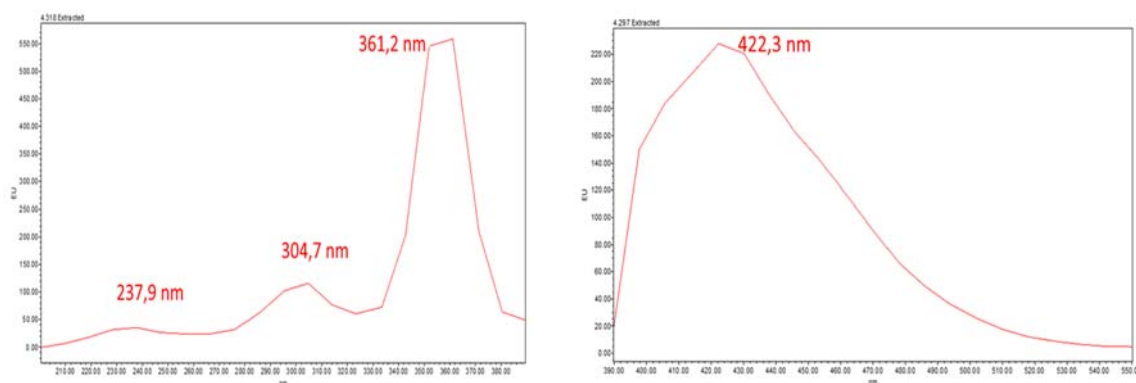


Figura 118. Espectro de fluorescencia de excitación (izquierda) y emisión (derecha) del *pico interferente*.

Como se puede observar, a pesar de que los espectros no tienen demasiada resolución, se puede apreciar que el *pico interferente* tiene características fluorescentes y presenta un máximo de excitación a 360 nm y un máximo de emisión de 420 nm.

Si se busca bibliográficamente el espectro de excitación y emisión del compuesto POPOP, los máximos de excitación y de emisión son similares a los del *pico interferente*. [Figura 119]

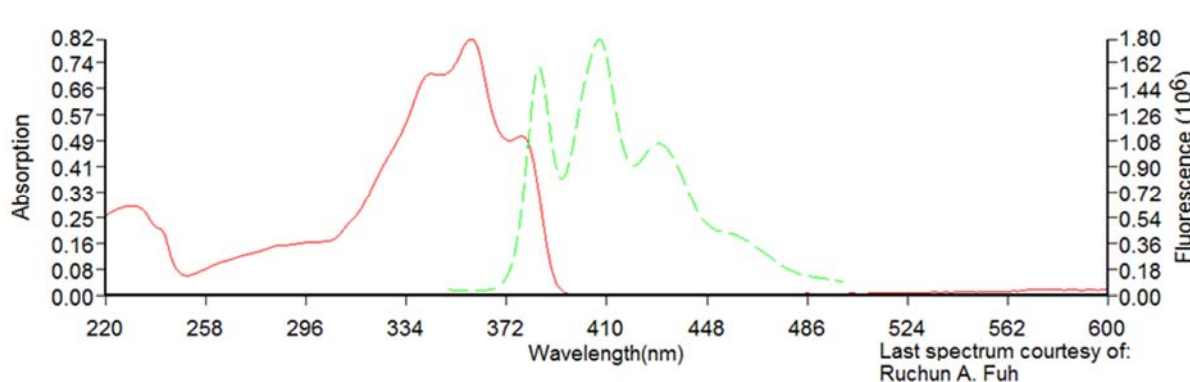


Figura 119. Espectros bibliográficos de excitación y emisión del POPOP en ciclohexano (PhotochemCAD)

- **Espectro de masas (impacto electrónico).**

Con la finalidad de obtener el espectro de masas de impacto electrónico, se ha analizado el extracto de los tapones de los viales *clíc* con un cromatógrafo de gases acoplado a un detector espectrómetro de masas. Para la separación, se utiliza una columna apolar HP5MS (30 m X 0,25 mm X 0,25 μ m). Como fuente de ionización se utiliza el impacto electrónico a 70 eV. El extracto se analiza en modo SCAN en un margen de relaciones m/z de 50 a 600.

El monitograma obtenido se presenta en la [Figura 120].

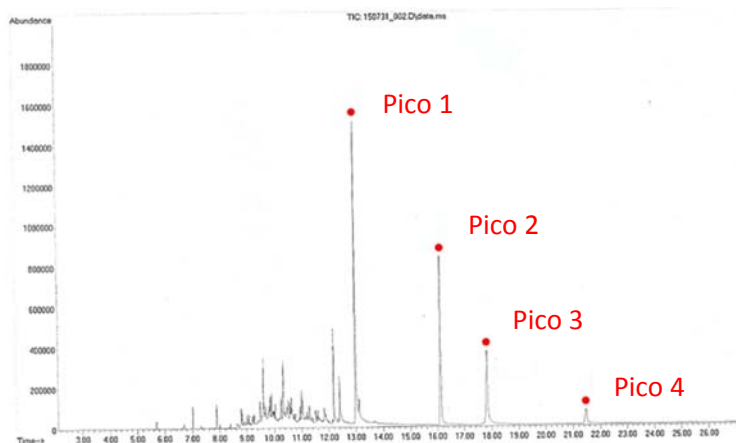


Figura 120. Monitograma obtenido al analizar el extracto de los tapones de tubo *cli* por HRGC-MS (EI/SCAN).

Como se puede observar en la [Figura 120], en el monitograma se detectan 4 picos que presentan mayor abundancia y sobre los cuales se estudiará su espectro de masas, con la finalidad de identificar, si alguno de ellos, corresponde al *pico interferente*. Para realizar la identificación, se comparan los espectros de masas obtenidos experimentalmente, con los que se tienen en la biblioteca *NIST (Mass Spectral Library)*.

En la [Tabla 159], se presentan los cuatro picos a estudio con sus tiempos de retención y el compuesto identificado por comparación del espectro de masas obtenido experimentalmente y el espectro bibliográfico.

Tabla 159. Picos identificados en el extracto de los tapones de los viales clic (con el pico interferente), analizado por HRGC-MS (IE/SCAN).

| PICO | Tiempo de retención (min) | Compuesto identificado |
|------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 1 | 13,0 | Erucamida (337,6 uma) |
| 2 | 16,1 | 4-colesten-3-ona (441,7 uma) |
| 3 | 17,8 | Compuesto no identificado con los espectros de la biblioteca |
| 4 | 21,4 | BBOT 2,5-Bis(5-tert-butil-benzoxazol-2-il)tiofeno (430 uma) |

Como se puede observar en la [Tabla 159], de los tres picos identificados el único que tiene características fluorescentes, considerando su estructura, es el BBOT (2,5-Bis(5-tert-butil-benzoxazol-2-il)tiofeno). Éste es un compuesto que tiene una masa molecular de 430 uma y es de la familia del PPOP, con el que el *pico interferente* se había obtenido una cierta relación tanto en los espectros de UV como en los espectros de fluorescencia, aunque no coincidían totalmente.

El espectro de masas obtenido experimentalmente y su comparativo bibliográfico en la biblioteca *NIST*, se presentan en la [Figura 121].

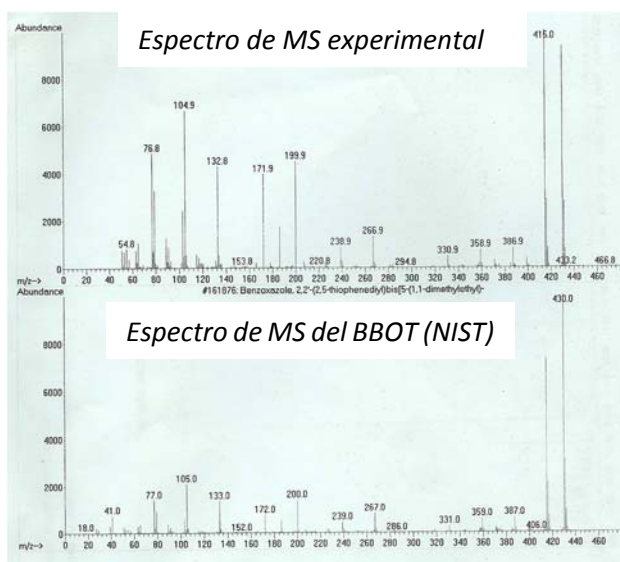


Figura 121. Espectro de masas del pico 4 (tiempo de retención 21,4 min) y espectro de masas bibliográfico del BBOT obtenido de la biblioteca *NIST*. Los dos espectros han estado obtenidos por impacto electrónico a 70 eV.

El BBOT es uno de los compuestos más comunes clasificados como agente blanqueador secundario, y se usa como abrillantador fluorescente en resinas termoplásticas de PVC, PE, PP,

resinas acrílicas, fibras de poliéster, entre otras. Por lo que podría ser un firme candidato a corresponder con el *pico interferente*.

Si se comparan los espectros de fluorescencia de excitación y emisión experimentales del *pico interferente* [Figura 118] y el de UV [Figura 116], y se comparan con los que se obtienen bibliográficamente para este nuevo compuesto (BBOT) [Figura 122] y [Figura 123], respectivamente, se observa que, a pesar de que la resolución no es comparable, sus máximos son muy parecidos.

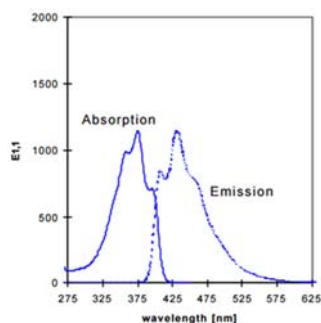


Figura 122. Espectros bibliográficos de excitación y emisión del BBOT obtenidos en DMSO. (F. W. Agent, 2008)

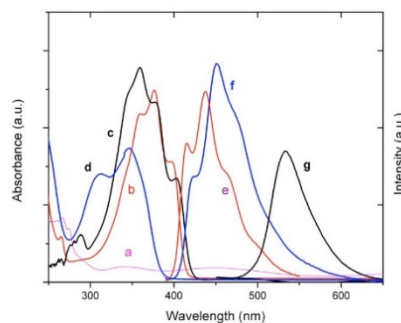


Figura 123. Espectro bibliográfico de UV del BBOT

[Optical absorption spectra of BBOP (a) unhoped perylene film (b) dissolved in $CHCl_3$ (c) BBOT containing and (d) 3HF-containing perylene film. Optical emission spectra of (e) BBOT dissolved in $CHCl_3$, (f) BBOT-containing perylene film ($\lambda_{ex}=380nm$) and (g) 3HF-containing perylene film ($\lambda_{ex}=350nm$)]. (M. Buffa, 2009)

- **UHPLC-MS.**

Para poder reunir más información sobre la masa molecular del *pico interferente*, se decide registrar su espectro de masas utilizando como fuente de ionización el electroespray (ESI).

Para ello, se inyecta el extracto obtenido con los tapones de los viales tubos *clic*, altamente concentrado en el compuesto de interés por UHPLC-MS. El equipo utilizado corresponde a un cromatógrafo de líquidos Acquity UPLC® con detector de UV y detector MS/MS Xevo TQ-S Micro, ambos conectados en serie, todos de la casa comercial Waters.

El método cromatográfico de separación corresponde con el método definitivo para la separación de los HAPs por UHPLC. De esta manera, el tiempo de retención del *pico interferente* será de aproximadamente 4,2 min. El detector de UV se fija a una longitud de onda de 254 nm (que permite situar el *pico interferente*). En el método de MS, se trabaja en modo SCAN, en un rango de masa (m/z) de 120 a 1000, tanto en ESI positivo como negativo. Se fija un voltaje de cono de 20 V (previamente optimizado con la mejor relación señal/ruido del pico a estudio) y un SCAN time de 0,1. Los resultados obtenidos se presentan en la [Figura 124].

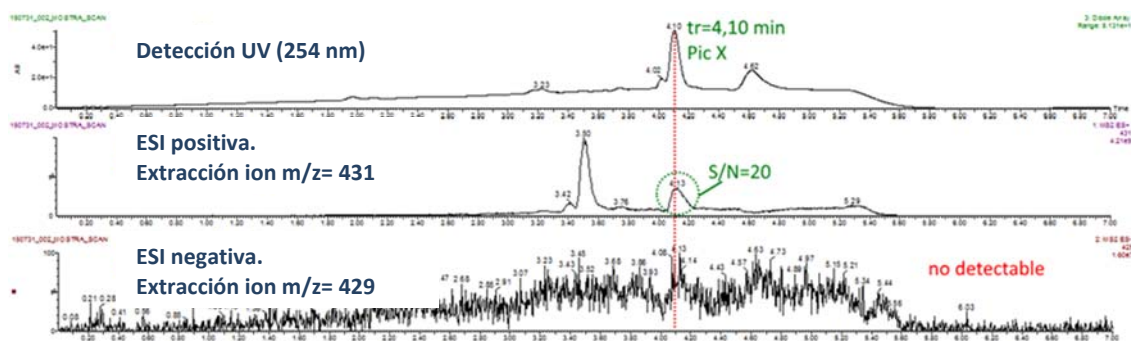


Figura 124. Cromatogramas del extracto de los tapones de los viales clic. Detección por DAD a una longitud de onda de 254 nm [superior]. Detección en SCAN (ESI positivo) extracción del ion m/z 431 [medio]. Detección en SCAN (ESI negativo) extracción del ion m/z 429 [inferior].

Como se puede observar en la [Figura 124], suponiendo que la masa molecular (M) del *pico interferente* es de 430, tal y como se ha obtenido en el estudio del espectro de masas obtenido por impacto electrónico, se decide realizar la extracción del ion 431 ($M+1$) cuando se trabaja con ESI (+) y el ion 429 ($M-1$) en ESI (-). Como se puede observar, en ionización ESI positiva, se detecta un pico que coincide en tiempo de retención con el *pico interferente*, mientras que en ESI negativo no se detecta, ya que el nivel de ruido es demasiado alto. Este resultado es coherente con la estructura del BBOT, ya que es un compuesto que por su estructura es difícil que se cargue negativamente.

El espectro de masas obtenido en SCAN (ESI +) del *pico interferente* se presenta en la [Figura 125].

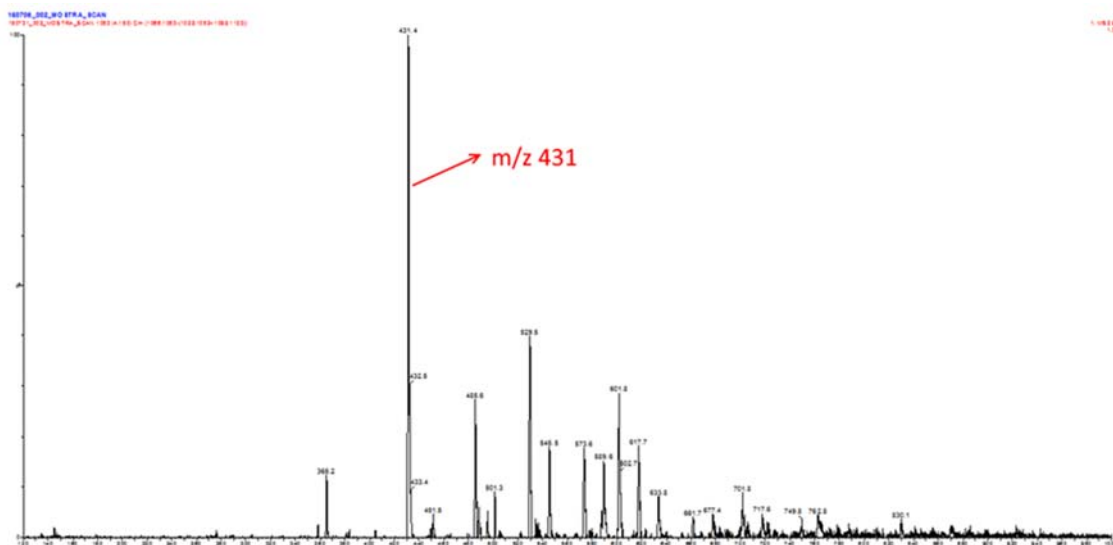


Figura 125. Espectro de masas del *pico interferente* obtenido en ESI positivo, del *pico* de tiempo de retención que se eluye a 4,1 min, aproximadamente (*pico interferente*).

El espectro de masas obtenido al analizar el extracto de los tapones de los viales tubo *clíc* por UHPLC con detector espectrómetro de masas con ionización por electroespray en modo SCAN positivo, confirma que la masa molecular del *pico interferente* podría ser 430 uma, que coincide con la masa molecular del BBOT.

- **Estructura propuesta para el *pico interferente***

Tanto la masa molecular, como los espectros de ultravioleta, fluorescencia y masas (por impacto electrónico) del *pico interferente*, son compatibles con la estructura del BBOT.

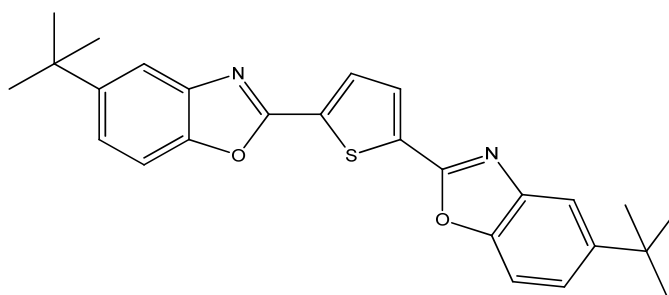


Figura 126. Estructura molecular del BBOT (2,5-Bis(5-tert-butyl-benzoxazol-2-il)tiofeno).

Ya que:

- Tiene una masa molecular de 430 uma, tal y como se ha deducido del espectro de masas obtenido tanto por HRGC-MS (EI) como por UHPLC-MS con ionización por ESI (+).
- Es un compuesto que da señal al UV y su espectro es compatible tanto en perfil como en posición del máximo de absorción con el *pico interferente*.
- Es un compuesto fluorescente y tiene un máximo de excitación entre 330-380 nm y un máximo de emisión a 410 nm, valores que coinciden con los resultados obtenidos experimentalmente para el *pico interferente*.
- Su espectro de masas bibliográfico obtenido por impacto electrónico, es compatible con el cuarto pico mayoritario que se detecta del análisis del extracto de los tapones de los viales tubo *clic* por HRGC-MS (EI).

2. DETERMINACIÓN DE HAPs EN MUESTRAS DE CAFÉ EN GRANO.

2.1. EL CAFÉ EN GRANO COMO MATRIZ DE ESTUDIO.

El grano de café se obtiene a partir de las semillas tostadas y molidas del fruto de la planta del café, llamada “cafeto”. Los cafetos son arbustos de las regiones tropicales de la familia de las *rubiáceas*, concretamente del género *Coffea*. Esta familia incluye más de 500 géneros y hasta 8000 especies. Su fruto es carnoso de color rojizo o púrpura y recibe el nombre de cerezas de café. Cuando se abre el fruto de la planta del café, se obtiene el grano de café cubierto por un casco semirrígido que corresponde con la pared del núcleo. Una vez retirado este recubrimiento, se encuentra el grano de café verde. (Café de Colombia®, " El arbol y el entorno ", s.f.)

Hasta 66 especies que pertenecen al género *Coffea* han sido descritas por *Linnaeus* el año 1753, pero sólo dos de ellas, tienen importancia económica: el café arábico (*Coffea Arabica*) y el café robusta (*Coffea Canephora*). El café arábico constituye $\frac{3}{4}$ partes de la producción del café mundial mientras que el café robusta constituye la cuarta parte restante.

Los granos de café se componen de más de 2000 sustancias diferentes, entre las cuales se encuentran cafeína, minerales, lípidos, trigonoleína, proteínas, carbohidratos.

En la [Tabla 160], se incluye la composición química media del café verde tanto del café arábico como del café robusta, expresado en porcentaje sobre materia seca (% sms).

Tabla 160. Composición química de los granos de café verde tanto de tipo arábico como robusta, expresado en porcentaje sobre materia seca (% sms). (Illy & Viani, 1995)

| COMPUESTO | Café arábico | Café robusta |
|---------------------|--------------|--------------|
| Cafeína | 1,2 | 2,2 |
| Trigonoleína | 1,0 | 0,7 |
| Aminoácidos totales | 10,3 | 10,3 |
| Aminoácidos libres | 0,5 | 0,8 |
| Carbohidratos | 57 | 61 |
| Ácidos alifáticos | 1,7 | 1,6 |
| Ácidos clorogénicos | 6,5 | 10 |
| Lípidos | 16 | 10 |
| Glicósidos | 0,2 | Trazas |
| Minerales | 4,2 | 4,2 |
| Potasio | 1,7 | 1,8 |

Nota: se marcan en negrita los porcentajes que diferencia principalmente las dos especies

Como se puede observar en la composición química de los dos tipos de café que se presentan, están formados mayoritariamente por carbohidratos y las principales diferencias radican tanto en el porcentaje del contenido de cafeína como en el de los ácidos clorogénicos²⁹ y de los lípidos.

El contenido de cafeína del café robusta es casi el doble del que se encuentra en el café arábico, en detrimento del contenido de lípidos. Este ocupa un contenido cercano al 10% en el café robusta y del 16% en el café arábico. Este elevado contenido lipídico es el responsable de que los HAPs puedan acumularse en este tipo de matriz. Entre la composición de lípidos del grano de café se puede destacar, que está constituida, mayoritariamente, por triglicéridos (70-80%), ésteres diterpenos (15-19%) y en menor proporción por triterpenos, esteroides y tocoferoles.

2.1.1. Proceso de la producción del café en grano.

El proceso de producción del café en grano consta de dos etapas principales: obtención del grano de café verde y la obtención del grano de café tostado.

A continuación, se desarrollan más ampliamente estas dos etapas de producción del café en grano.

a) Obtención del grano de café verde.

Cuando el fruto de café está maduro, comienza la recolección del café (entre 7 y 9 meses después de la floración en el café arábico y entre 9 y 11 meses en el café robusta). Se realiza, mayoritariamente, de forma manual y selectiva, recogiendo sólo los granos más maduros. Aunque también se puede realizar de forma automática mediante el raspado o despallado de la rama de cafeto.

Recogido el fruto del café (café cereza), se debe retirar la pulpa que lo recubre para obtener el grano de café verde. Este proceso se puede realizar mediante el método seco o el método húmedo. (Illy & Viani, 1995)

El *método seco* se utiliza fundamentalmente para el café robusta y para gran parte del café arábico de Brasil, Etiopía, Haití, Paraguay y, parcialmente, en Ecuador e India. En este caso, los frutos de café se extienden en tendales de cemento en capas de 8 cm de espesor que se van removiendo varias veces al día. Así, en este caso, los granos se secan al sol durante 10 o 20 días hasta que queda un 12,5% de la humedad. El café seco se pela para eliminar la capa exterior y obtener el café oro o café verde.

²⁹ Los **ácidos clorogénicos** (CGA) son metabolitos secundarios que juegan un papel importante en la protección de la planta respecto a los insectos y los ataques microbianos. El ácido clorogénico más abundante en la naturaleza y en el café en particular, es el ácido 5-cafeoilquínico. Aunque el Comité Científico del Café acepta atribuir el término CGA a los ácidos de la familia del ácido quínico incluyendo el ácido cinámico, cafeico, ferúlico, isoferúlico y sináptico.

El *método húmedo* se utiliza en Colombia, Costa Rica, Honduras, Guatemala, el Salvador y Kenia. En este caso, los granos maduros se sumergen en agua para eliminar los granos menos pesados y se procesan con máquinas despulpadoras para sacar la capa exterior que cubre el fruto. Se obtiene por una parte el café baba (es el grano cubierto por el pergamino) y la pulpa que se utiliza como compost. Después, se produce una fermentación del café baba en tanques, donde se da un proceso enzimático que descompone las capas que cubren el grano. Finalmente, el grano de café se lava y se seca al sol o artificialmente. Se le saca la piel que lo cubre produciendo un grano limpio y verde que se puede comercializar.

b) **Obtención del grano de café tostado.**

Durante el proceso inicial de obtener el grano verde, prácticamente no se modifican las propiedades químicas del grano. Donde se produce la verdadera transformación es durante el proceso del tostado del café.

El tostado es un proceso térmico intenso, que puede ser aplicado directamente a través de una llama o indirectamente en un horno eléctrico. Consta básicamente en el calentamiento de los granos de café verde hasta una temperatura máxima de 250°C. Por esta razón, durante este proceso, se producen un gran número de reacciones pirolíticas que transforman el grano tanto física como químicamente. El grano adopta un color oscuro que varía en función de cómo se ha llevado a cabo el proceso de calentamiento y el enfriamiento posterior. A nivel químico, la composición del grano se ve drásticamente modificada, formándose un gran número de nuevas sustancias que darán, posteriormente, al café tostado sus características de aroma y gusto. (Orecchio, Ciotti, & Culotta, 2009)

2.1.2. Fuentes de contaminación de HAPs en el café en grano.

La presencia de los HAPs en el café en grano se puede atribuir, fundamentalmente, al procesado del café verde a café tostado, debido a que se produce un calentamiento intenso. De manera, que puede hacer pensar en un aumento claro de estos contaminantes en el grano comercializado.

En estudios bibliográficos, se ha podido observar que la concentración de HAPs en los granos de café tostado es función del tiempo y de la temperatura a la que se produce. Además, se contempla la posibilidad de que durante este proceso de tostado, también se produzca una transformación de HAPs de masa molecular más baja a HAPs de masa molecular más elevada cuando la temperatura del proceso de tostado aumenta. (Alexander, Benford, Cockburn, Cravedi, & Dogliotti, 2008)

Realmente, es importante tener en cuenta, que la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos corresponde a una de las determinaciones adicionales, junto con el análisis de pesticidas y micotoxinas, como posibles contaminantes del café en grano. (Illy & Viani, 1995)

2.1.3. Procedimientos de análisis para la determinación de HAPs en el café en grano. Antecedentes bibliográficos.

Existen diferentes métodos analíticos para la determinación de HAPs en muestras de café en grano. El principal problema en el análisis de este grupo de contaminantes, al igual que sucedía en las otras matrices estudiadas, es tanto el bajo nivel de concentración que estos se encuentran en la muestra, como las interferencias por efecto matriz, así como la dificultad de extraer selectivamente los compuestos a estudio de una matriz con un contenido lipídico del orden del 13% (p/p).

Bibliográficamente, se han encontrado concentraciones de BaP en café tostado desde 0,1 a 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aunque en ocasiones se han podido encontrar hasta niveles de concentraciones superiores a los 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Por lo que se debe conseguir un procedimiento que pueda llegar, al menos, a estos niveles de concentración. (Institut national Agronomique Paris-Grignon & Inra U.M.R.I., 2006)

Es importante diferenciar, si el análisis de los contaminantes se realiza sobre la matriz sólida, es decir, sobre el grano de café, o en la bebida o el extracto líquido acuoso. Sobre el café en grano, la concentración de este tipo de contaminantes orgánicos será más elevada ya que estos tienen una afinidad con la matriz con un elevado contenido lipídico. Sin embargo, los niveles de los HAPs en la bebida siempre serán menores que en el grano debido a la baja solubilidad que tienen estos compuestos en agua, a pesar de que la extracción se realice en caliente y a alta presión.

Los procedimientos propuestos en bibliografía para la determinación de HAPs en el café en grano suelen ser complejos e incluir varias etapas. Normalmente, constan de una primera etapa de extracción sólido- líquido, llevada a cabo por Soxhlet o ASE (*Accelerated Solvent Extraction*) utilizando disolventes orgánicos apolares o de polaridad media como acetona, metanol, hexano o mezclas binarias de estos. A esta etapa de extracción, le suele seguir una etapa de purificación o *clean-up*, ya sea con ácido sulfúrico para eliminar toda la materia orgánica que se ha podido extraer, como con cartuchos de extracción en fase sólida combinados, tipo C18 y de sílice. En alguno de los casos, previa a esta etapa de purificación se incluye una saponificación previa, para disolver la grasa que se ha podido extraer con el disolvente orgánico y, facilitar así, la posterior extracción de los HAPs del extracto orgánico. Finalmente, igual que en todos los casos desarrollados, el extracto orgánico se concentra y se reconstituye con un pequeño volumen de disolvente adecuado, para poder ser inyectado bien por cromatografía de gases con detector de espectrómetro de masas o por cromatografía líquida con detector de fluorescencia. (Institut national Agronomique Paris-Grignon & Inra U.M.R.I., 2006); (García Falcon, 2005)

2.2. DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE HAPs EN MUESTRAS DE CAFÉ EN GRANO.

Se procede al desarrollo de un procedimiento para la determinación de los HAP8 (BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, diBahA, BghiP e IP) en muestras de café en grano.

Aunque la UE, en el Reglamento nº835/2011, no especifica un nivel límite de HAPs ni en el grano de café ni en la bebida, el Comité Científico de los Alimentos propone a los estados miembros de la UE estudios de este tipo de compuestos en matrices alimentarias donde es posible su presencia. Entre las categorías especificadas se incluye el café. Además, ello conlleva que alguno de los países de la unión establezcan límites para esta familia de contaminantes, como ahora la República Checa que establece como valor límite de los HAP8 en el grano de café tostado en 2 µg/kg.

Teniendo en cuenta esta consideración, el procedimiento a poner a punto debe llegar, al menos a una concentración entre 10 y 100 veces inferior a este valor límite propuesto.

La muestra que se ha utilizado para llevar a cabo la puesta a punto del procedimiento corresponde a un café molido comercial tipo “natural”.

2.2.1. Optimización de la preparación de la muestra.

3.2.1.1 Etapa de extracción.

El grano de café tiene una composición química compleja y, además, tiene un contenido lipídico superior o igual al 10% (p/p).

Para realizar la extracción de los HAPs del grano de café sólido con disolvente, se puede realizar tanto por ultrasonidos, como por Soxhlet como con ASE (*Accelerated Solvent Extraction*). En este caso, se propone aprovechar la disponibilidad del sistema de ASE (ASE 350 de *Dionex*) que tiene la Sección de Cromatografía del IQS para llevar a cabo la extracción. De esta manera, la extracción por muestra es mucho más rápida y, en principio, proporciona resultados de recuperación y repetibilidad iguales o mejores a las que se obtendrían con una extracción con Soxhlet.

El sistema ASE, tal y como se ha comentado en el capítulo anterior de la presente tesis, permite la extracción de compuestos orgánicos de una matriz sólida o semisólida utilizando un disolvente orgánico, a temperatura y presión elevadas, en una atmósfera exenta de oxígeno. De esta manera, se consigue aumentar mucha la eficiencia de la extracción.

De forma general, una determinada cantidad de muestra sólida triturada se introduce dentro de la celda de extracción. En este caso, las celdas disponibles son de acero inoxidable y son de

un volumen de 33 mL. En su interior, es donde se introduce la muestra y se mezcla convenientemente con un dispersante y/o desecante. En este caso, esta doble función la realiza la tierra de diatomeas. Durante el proceso de extracción, la celda caliente se llena con disolvente hasta conseguir una presión interior de unas 1500 psi. En estas condiciones, el disolvente está en contacto con la muestra a temperatura y presión elevadas, durante un determinado periodo de tiempo (*static time*). Después de este periodo, el extracto líquido se introduce dentro del vial colector. Este proceso, se puede repetir varias veces, si se considera necesario. Normalmente, con este tipo de celdas, el volumen del extracto, si se realizan dos ciclos de extracción, sería de unos 40 mL.

Así, para optimizar el proceso de extracción con ASE, se decide ensayar diferentes disolventes y varias condiciones de extracción, entre las que se variará tanto la temperatura como el *static time*.

- **Variación del disolvente de extracción.**

Los disolventes ensayados para la extracción de los HAPs con el sistema ASE son: acetona, acetona/hexano (50:50), tolueno y hexano. Se han escogido estos disolventes, ya que son los más utilizados en bibliografía para extraer este tipo de compuestos. Además, se incluye un disolvente apolar como es el hexano, uno polar como es la acetona y otro disolvente de estructura equivalente a los compuestos a estudio, el tolueno.

Es importante destacar, que tanto la acetona como el hexano, son disolventes altamente volátiles con puntos de ebullición de 56°C y 68°C, respectivamente. Por lo que la etapa de concentración, posterior a la extracción sólido-líquido, será mucho más rápida. Sin embargo, el tolueno con un punto de ebullición de 111°C, su concentración será más lenta.

El estudio de los disolventes de extracción se realiza sobre muestras adicionadas con HAPs a un nivel más alto del que es previsible encontrar estos contaminantes en las muestras. Así, sobre 10 g de café en grano molido mezclado con tierra de diatomeas, se adicionan 250 µL de un patrón de 1000 ng/mL que contiene los 16 EPA-HAPs disueltos en acetona, preparado por dilución desde el patrón concentrado comercial PAH MIX9 de 100 mg/L. Se realiza la extracción ASE en las condiciones en que habitualmente se extraen los HAPs en muestras de inmisiones atmosféricas (Capítulo III), es decir, dos ciclos a 100°C de 8 minutos cada uno. En realidad, estas condiciones podrían ser diferentes en función del disolvente utilizado pero, es importante destacar, que las condiciones que se proponen consideran una temperatura bastante elevada (temperatura máxima de trabajo en el equipo ASE es de 120-150°C) y un tiempo de ciclo largo, ya que normalmente, los ciclos suelen ser de unos 5 minutos.

Después de realizar la extracción ASE, el extracto orgánico obtenido se concentra hasta sequedad con corriente de nitrógeno y se reconstituye con 1 mL con acetonitrilo. El extracto se inyecta en las condiciones cromatográficas de UHPLC-FLU, equivalentes a las que se habían utilizado para determinar HAPs en muestras de leche.

Así, los extractos deberían tener una concentración en disolución de 250 ng/mL (equivalente a 25 µg/kg en muestra).

Los extractos obtenidos, presentan un perfil complejo, indicando que será necesario realizar algún tipo de purificación. Sin embargo, si se realiza una comparación cromatográfica de los perfiles obtenidos con cada uno de los disolventes ensayados, se observa que el disolvente que permite obtener una mejor recuperación es el hexano, seguido del tolueno, la acetona y la mezcla hexano/acetona, aunque las diferencias son mínimas. La acetona y la mezcla se descartan, ya que, como incluye un disolvente polar, se extraen muchos más compuestos a parte de los HAPs, obteniéndose perfiles aun más complejos y con mayor nivel de posibles interferencias. Así, se escoge el hexano como disolvente de extracción ya que, además de ser el que ofrece mejores recuperaciones, es un disolvente más volátil que el tolueno.

- **Variación de las condiciones de extracción ASE.**

Una vez seleccionado el disolvente de extracción, se propone optimizar las condiciones de trabajo del equipo ASE. Los parámetros que se han considerado son: la temperatura y el tiempo de duración de los ciclos de extracción. Se mantienen fijos tanto el número de ciclos (se realizarán dos ciclos en cada uno de los casos) y la presión, ya que el equipo llena la celda de disolvente hasta llegar a una presión interior de unas 1500 psi.

En la [Tabla 161], se presentan las condiciones de extracción ASE ensayadas. Se proponen tres temperaturas (100, 120 y 150°C) y tres tiempos de ciclos (5, 8 o 10 minutos) diferentes.

Tabla 161. Resumen de las condiciones de extracción ensayada, utilizando hexano como disolvente. Para extraer HAPS de muestras de café en grano.

| Experiencia | Temperatura [°C] | Tiempo de ciclo [min] |
|-------------|------------------|-----------------------|
| 1 | 100 | 8 |
| 2 | 100 | 5 |
| 3 | 120 | 5 |
| 4 | 120 | 8 |
| 5 | 120 | 10 |
| 6 | 150 | 5 |

En este caso, el estudio se realiza adicionando sobre la celda del ASE llena de tierra de diatomeas y con tan solo 1 g de muestra de café en grano molido, 100 µL del patrón conjunto de los 16 EPA-HAPS de 1000 ng/mL, preparado en acetonitrilo por dilución a partir del patrón concentrado comercial PAH-MIX9 (100 mg/L). Se decide adicionar muy poca muestra para evitar que el efecto matriz impida calcular la recuperación, ya que, en este caso, no se realiza purificación posterior. Los extractos obtenidos, se reconstituyen con 1 mL de acetonitrilo, para poder ser inyectados por UHPLC-FLU, en las mismas condiciones cromatográficas utilizadas en el estudio de los disolventes.

Así, en este caso, los extractos deben tener una concentración de 100 ng/mL (100 µg/kg equivalente en muestra).

En la [Figura 127], se presentan los resultados de recuperación para cada uno de los HAP8, en las seis experiencias realizadas.

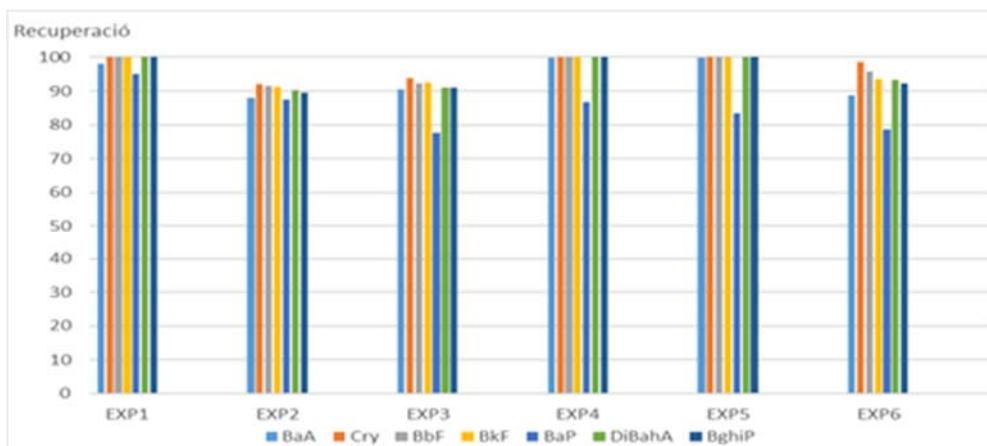


Figura 127. Valores de recuperación obtenidos para cada uno de los HAP8, en las diferentes condiciones de ASE ensayadas para extracción de HAPs en muestras de café en grano, utilizando hexano como disolvente de extracción.

Como se puede observar en la [Figura 127], en general, todas las combinaciones ensayadas presentan buenas recuperaciones. Sin embargo, los métodos que proporcionan peores resultados corresponden a las experiencias 2 y 3. En ambos casos, coincide con tiempos de ciclo cortos, de sólo 5 minutos. En la experiencia 6 donde también se trabaja con un ciclo de 5 minutos, los resultados son sólo ligeramente mejores debido a que se trabaja con la temperatura más alta ensayada. Sin embargo, los resultados son mejores cuando se trabaja con ciclos de extracción más largos (experiencias 1, 4 y 5). Por esta razón, se decide trabajar con ciclos de 8 minutos.

En lo que hace referencia a la temperatura (100, 120 y 150°C) y valorando únicamente las experiencias que trabajan con ciclos de extracción superiores a 5 minutos (experiencias 1 (100°C/8 min), 4 (120°C/8 min) y 5 (120°C/8 min)) y considerando los resultados de todos los HAPs, los mejores resultados los ofrece la experiencia 1 que trabaja a 100°C. Las experiencias 4 y 5 se descartan, ya que, a pesar de que trabajan a temperatura más elevada, los valores de recuperación para el BaP son peores.

Por lo tanto, la extracción de los HAPs del café en grano se realiza utilizando hexano como disolvente y con un método de extracción ASE que trabaja a una temperatura de 100°C, con dos ciclos de extracción de 8 minutos.

Es importante destacar, que las condiciones del ASE propuestas para la extracción de los HAPs en café en grano son equivalentes a las que se habían propuesto para extraer el mismo tipo de compuestos pero en muestras de aire ambiente (Capítulo III), con la única diferencia que en lugar de utilizar hexano como disolvente de extracción, propone trabajar con acetona.

3.2.1.2 Etapa de purificación.

Como los extractos obtenidos generan en el cromatograma una línea de base elevada y bastantes picos interferentes y parece difícil poder bajar a los límites de cuantificación exigidos para este tipo de muestras, parece imprescindible introducir una etapa de purificación de los extractos.

Bibliográficamente, se proponen diferentes formas de purificación o *clean-up*, entre las que se destacan, la saponificación y la purificación con cartuchos de extracción en fase sólida, tanto C18 como de sílice. En muchas ocasiones, incluso se proponen combinaciones entre ambas formas de purificación.

La saponificación tiene como objetivo la hidrólisis de las grasas, tal y como se ha demostrado en el análisis de HAPs con muestras de leche. Esta forma de purificación parece adecuada para la matriz de estudio, ya que el grano de café contiene hasta un 16% (p/p) de sustancias lipídicas y, entre ésta, hasta el 70% son triglicéridos. Además, como la primera etapa de extracción de los HAPs en la matriz de estudio utiliza hexano como disolvente, la mayor cantidad de los triglicéridos se habrán extraído junto con los HAPs, y estarán, mayoritariamente, en el extracto orgánico obtenido.

Aprovechando los estudios realizados para la determinación de HAPs en muestras de leche, se propone comenzar la purificación del extracto con una reacción de saponificación, aprovechando las mejores condiciones propuestas en el apartado anterior [apartado 1.3, Capítulo IV, página 327]. Así, se propone adicionar sobre unos 2 mL del extracto orgánico obtenido de la extracción por ASE, 7,5 mL de una disolución de potasa metanólica (2 M), en un vial o erlenmeyer de 100 mL tapado con tapón de vidrio esmerilado. La mezcla se calienta a 80°C durante 2 horas. Posteriormente, se adiciona agua MilliQ para aumentar el volumen de la fracción acuosa y se extraen los compuestos a estudio utilizando también hexano como disolvente (10 mL de hexano por triplicado). El extracto orgánico se seca con sulfato de sodio, se concentra a sequedad y se reconstituye con acetonitrilo para ser inyectado por UHPLC-FLU.

Además de la saponificación como técnica de purificación de los extractos obtenidos en el ASE, se propone realizar una purificación con cartuchos de extracción en fase sólida. Sin embargo, en lugar de utilizar los cartuchos propuestos en bibliografía (sílice o C18), se propone utilizar los cartuchos con polímeros de impresión molecular (MIPs) diseñados específicamente para la selección y separación de los HAPs más pesados de matrices altamente (cartuchos SUPELMIP SPE-PAHs (50 mg/3 mL) de Supelco, referencia 52773-U)³⁰. Es importante destacar, que estos

³⁰ Los cartuchos SUPELMIP, son cartuchos de extracción en fase sólida (SPE), constituidos por polímeros altamente reticulados diseñados específicamente para extraer un determinado tipo de compuestos, relacionados estructuralmente, consiguiendo un altísimo grado de selectividad. Estos polímeros se denominan Polímeros de Impresión Molecular (MIP). Esta elevada selectividad se consigue gracias a la síntesis del MIP. La molécula "plantilla", está diseñada para que forme una serie de cavidades, también denominadas impresiones, que son complementarias con el analito/s para el que es/son selectivo/s, tanto estérica como químicamente. Así, se crean múltiples interacciones tipo puente de hidrógeno, iónicas, de Van der Waals o hidrofóbicas entre analito y MIP, haciendo que sea altamente selectivo. (Supelco: App. Note 193). Los cartuchos SUPELMIP™ SPE-PAHs son selectivos a los HAPs pesados tales como BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP e IP, es decir, los HAP8.

cartuchos se han utilizado en aceites pero no se conocen ensayos con otro tipo de matrices. La principal diferencia entre este tipo de cartuchos de SPE y los convencionales, es que los cartuchos que utilizan MIP retienen los analitos de interés, y los separan, más o menos selectivamente, de los otros componentes de la matriz muestra. Así, los eluatos obtenidos en la etapa de lavado del cartucho después de sembrar la muestra, se desechan. El único extracto que se recoge, es el que se obtiene de la etapa de elución. En los cartuchos de SPE convencionales, los eluatos, tanto de la etapa de lavado como de elución, se juntan y constituyen el extracto de interés.

Las condiciones de trabajo con los cartuchos SUPERMIP SPE-PAHs se incluyen en la [Tabla 162].

Tabla 162. Etapas para la obtención de los extractos purificados con los cartuchos SUPERMIP SPE-PAHs.

| ETAPAS | Descripción |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Acondicionamiento | 1 mL de ciclohexano |
| Carga de la muestra | Tomar 1 mL del extracto obtenido después de la saponificación y de la extracción L-L con hexano Mezclar con 1 mL de ciclohexano (dilución 1:1) |
| Lavado | 1 mL de ciclohexano <i>Eliminar el extracto obtenido hasta el momento</i> |
| Elución selectiva | 3 x 1 mL de acetato de etilo Recoger el extracto |
| Concentración del extracto y reconstitución | Concentras el extracto a sequedad Reconstituir el volumen necesario con acetonitrilo |

Para ensayar estos dos métodos de purificación, se propone trabajar con una muestra adicionada (10 g de café en grano molido adicionado con 100 µL de un patrón conjunto con los 16 EPA-HAPs de 1000 ng/mL, preparado por dilución a partir del patrón comercial PAH MIX9). Primero, se realiza la extracción ASE con hexano, en las condiciones propuestas. El extracto orgánico obtenido, se concentra.

Con el extracto concentrado, se proponen diferentes opciones de purificación:

- Saponificación
- Purificación con el cartucho SUPERMIP SPE-PAHs
- Doble saponificación
- Saponificación seguida de una purificación con el cartucho SUPERMIP SPE-PAHs

Los perfiles cromatográficos obtenidos cuando se utiliza sólo una de las técnicas de purificación, ya sea saponificación o purificación con cartucho no son suficientemente limpios y presentan interferencias, en la zona de elución de los HAPs más pesados.

En la [Figura 128], se presentan los resultados obtenidos al analizar los extractos por UHPLC-FLU, obtenidos después de la purificación por saponificación, saponificación más cartucho y doble saponificación. No se incluyen los resultados obtenidos al analizar el extracto que ha sufrido sólo la purificación con el cartucho SUPELMIP SPE-PAHs, ya que, la línea de base obtenida es demasiado alta y no permite determinar los HAPs a estudio.

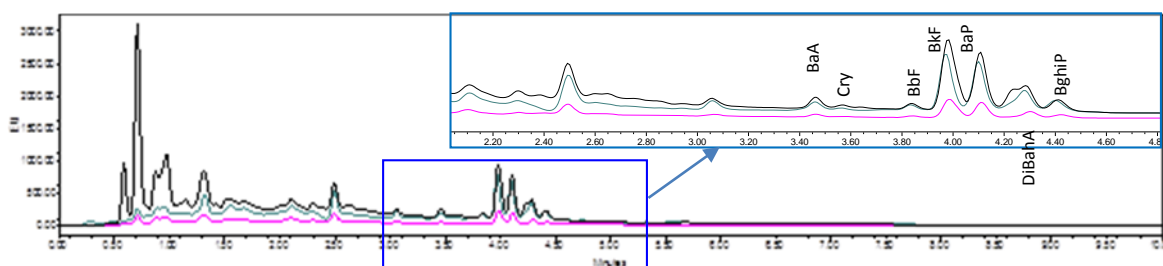


Figura 128. Cromatogramas obtenidos al analizar los extractos de las muestras adicionadas por UHPLC-FLU (296/405), sometidas a los diferentes procesos de purificación propuestos: saponificación (color negro), saponificación seguida de cartucho (verde) y doble saponificación (rosa). Ampliación de la zona de elución de los HAPs.

Como se puede observar, el inicio del cromatograma mejora mucho cuando se incluyen dos etapas de purificación en serie, ya sea una doble saponificación o saponificación seguida de cartucho. Sin embargo, considerando dos etapas de purificación, cuando se propone una doble saponificación, la recuperación de los HAPs es más baja, mientras cuando se combina la saponificación con los cartuchos SUPELMIP SPE-PAHs se obtienen unos valores adecuados de recuperación y extractos con menos interferencias.

Así, se propone realizar una doble purificación sobre los extractos obtenidos del ASE: saponificación seguida de una percolación del extracto a través de los cartuchos de impresión molecular SUPELMIP SPE-PAHs.

2.3. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE HAPs EN MUESTRAS DE CAFÉ EN GRANO.

A continuación se adjunta de forma resumida, la descripción del procedimiento propuesto para la determinación de los HAPs en muestra de café en grano.

Características generales

| | |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Analitos | BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP e IP (HAP8) |
| Matriz | Café en grano molido |
| Rango de trabajo | HAPs individuales: 0,1 a 16 µg/kg HAP4 (Σ BaA, Cry, BbF, BaP): 0,4-64 µg/kg HAP8 (Σ BaA, Cry, BbF, BaP, BkF, DiBahA, BghiP, IP) 0,8-128 µg/kg |
| Técnica de análisis | UHPL-FLU |
| Límites especificación legislados | <i>No existen límites legislados para café, ni en grano ni en bebida. (Reglamento 2006/1881/CE). Se incluyen los valores indicados por la Republica Checa para los HAP8, según los estudios propuestos por la SCF.</i> HAP8 → inferior a 2 µg/kg Por lo que se podría decir que los HAPs individuales deberían ser inferiores a 0,25 µg/kg |

Conservación y acondicionamiento de las muestras

| | |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Conservación | Las muestras se conservan en la nevera (2-8°C). Mantener el grano sin moler, si la muestra lo permite. |
| Homogenización | Sacar la muestra sólida de la nevera, acondicionar a temperatura ambiente y moler hasta obtener una mezcla fina y homogénea. |

Preparación de reactivos

| | |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| KOH (metanólica) | Disolución de KOH 2M en metanol: Pesar unos 39,6 g de hidróxido de potasio en un vaso de precipitados de 500 mL. Adicionar 300 mL de metanol y disolver completamente en un baño de ultrasonidos. |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Preparación inicial de la muestra

| | |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Muestra [Preparación de la celda del ASE] | En una celda de ASE de 33 mL, poner el filtro en la parte inferior y una fina capa de tierra de diatomea para aislar. Mezclar 5 g de muestra (grano de café molido) con suficiente tierra en una cápsula e introducir la mezcla en la celda. Seguir adicionando tierra de diatomeas, mezclando directamente en su interior, hasta conseguir que la celda queda completamente llena y bien compactada. <i>Es imprescindible que quede bien compacta para evitar que se creen caminos preferentes durante la extracción.</i> |
| Muestra adicionada | Se prepara igual que la muestra pero en la celda de ASE, junto con los 5 g de muestra y la tierra de diatomea, se adicionan 25 µL (con control de pesada) de un patrón de 1000 ng/mL de los 16 EPA-HAPs, preparado en acetonitrilo. |

Tratamiento de la muestra

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>1. Extracción sólido-líquido con ASE</p> | <p>Equipo: ASE 350 (<i>Dionex</i>). Disolvente: Hexano</p> <p>Método extracción ASE: Temperatura: 100°C <i>Static time</i>: 8 min <i>Cycles</i>: 2 <i>Rinse volume</i>: 60% <i>Purge time</i>: 100 s</p> <p><i>Nota: Es importante que antes de utilizar la celda, ésta se haya limpiado convenientemente con el disolvente de extracción. (ver Capítulo III, apartado 3.3.2).</i></p> |
| <p>2. Concentración extracto</p> | <p>Sistema de concentración: <i>TurboVap®II Caliper-Zymark</i>. Permite la concentración automática con nitrógeno.</p> <p>El extracto obtenido en el ASE (aprox. 40 mL) que se tiene en el vial colector, se pasa a un vial de <i>TurboVap</i> donde se concentra, con corriente de nitrógeno y temperatura del baño a 40°C, hasta un volumen final aproximado de 2 mL.</p> |
| <p>3. Saponificación</p> | <p>El extracto obtenido en la extracción sólido-líquido (2 mL), se pasa a un vial de espacio de cabeza de 20 mL. Se adicionan 7,5 mL de la disolución de KOH 2M, y se tapa con septum de alta temperatura y cápsula de aluminio.</p> <p>La muestra bien tapada, se introduce en un horno a 80°C donde se mantiene durante 2 horas.</p> <p>Posteriormente, se saca la muestra del horno y se deja temperar. Se adicionan 7,5 mL de agua MilliQ en el vial donde se ha realizado la saponificación, y se agita vigorosamente.</p> |
| <p>4. Extracción líquido-líquido de los HAPs</p> | <p>Para no tener problemas con el volumen, traspasar a un vial de 30 mL, arrastrando bien el extracto con un poco más de agua MilliQ.</p> <p>Se adicionan 10 mL de hexano. Se agita y con una pipeta <i>Pasteur</i>, se separa la fracción orgánica (superficial).</p> <p>El proceso de extracción se repite dos veces más, juntado los extractos orgánicos en un nuevo vial de cómo mínimo 30 mL, tipo tubo <i>clic</i>.</p> |
| <p>5. Secado, filtración y concentrado del extracto orgánico</p> | <p>Adicionar suficiente sulfato de sodio en el vial donde se tiene el extracto orgánico, para conseguir secar el extracto orgánico (hasta floculación).</p> <p>Es importante, no utilizar el tapón de plástico del vial tubo <i>clic</i> para tapar el extracto, para evitar la aparición del <i>pico interferente</i> que puede anular la determinación del DiBaha [página 355].</p> <p>Pasar a través de un papel de filtro, colocado en un embudo, el extracto seco para separar el sulfato sódico.</p> <p>Introducir el extracto orgánico filtrado en un tubo de <i>TurboVap®</i> (volumen aproximado de 30 mL) y concentrar hasta aproximadamente 3 mL con corriente de nitrógeno.</p> |
| <p>6. Purificación con cartuchos SUPELMIP SPE-HAPs</p> | <p><i>Cartuchos SUPELMIP™ SPE-PAHs (50 mg/3 mL).</i> <i>Ref.: Supelco 52773-U</i> <i>Acondicionamiento:</i> 1 mL de ciclohexano (<i>waste</i>) <i>Carga del extracto (aprox. 3 mL) mezclado con unos 3 mL de ciclohexano</i> <i>Lavado:</i> con 1 mL de ciclohexano (<i>waste</i>) <i>Elución:</i> 3x1 mL de acetato de etilo (Extracto con los HAPs)</p> |

| | |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7. Concentración del extracto | Con corriente de nitrógeno en baño de agua caliente (50°C) hasta sequedad |
| 8. Reconstitución | Adicionar 200 µL de acetonitrilo en el mismo tubo graduado de fondo cónico donde se ha concentrado el extracto (controlando el volumen añadido por pesada). Agitar en un baño de ultrasonidos y transvasar el extracto a un vial de inyector automático de 2 mL con <i>microinserto</i> . |

Análisis por UHPLC-FLU

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sistema | Acquity UPLC® con detector de fluorescencia Acquity de Waters |
| Patrones de calibración | 2, 40, 80, 200 y 400 ng/mL Rango equivalente en muestra: 0,1 a 16 µg/kg. Los patrones se preparan por dilución sucesivas a partir de un patrón conjunto de HAPs (PAH MIX9 de <i>Dr. Ehrenstorfer</i> ref.: XA20950009AL, concentración 100 mg/L) |
| Columna | Zorbax Eclipse PAH (50 X 3 mm; 1,8 µm) |
| Condiciones cromatográficas | Volumen de inyección: 2 µL. Temperatura de la columna: 33,0 ± 2,0°C Flujo: 0,77 mL/min Fase móvil: (A) Agua MilliQ (B) Metanol/Acetonitrilo (50:50) Programa de gradiente : 0,00 min: 50% FM(B) – <i>gradiente lineal</i> 1,85 min: 71% FM(B) – <i>gradiente lineal</i> 3,64 – 5,00 min: 100% FM(B) 5,09 – 6,00 min: 50% FM(B) – <i>equilibrado condiciones iniciales</i> |
| Condiciones de detección (FLU) Nota: permite la detección de los 16 EPA-HAPs | CANAL A: 0,00 – 2,80 min: $\lambda_{ex} = 250/\lambda_{em} = 376$ nm (Fe, An) 2,80 – 3,65 min: $\lambda_{ex} = 333/\lambda_{em} = 390$ nm (Pyr) 3,65 – 6,00 min: $\lambda_{ex} = 318/\lambda_{em} = 510$ nm (IP) CANAL B: 0,00 – 2,60 min: $\lambda_{ex} = 280/\lambda_{em} = 340$ nm (Na, Ace, Flu) 2,60 – 3,10 min: $\lambda_{ex} = 285/\lambda_{em} = 450$ nm (Flt) 3,10 – 6,00 min: $\lambda_{ex} = 296/\lambda_{em} = 405$ nm (BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP) |

Cuantificación

| | |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Cuantificación | La cuantificación de las muestras se realiza por el método de las adiciones estándar. |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|

2.4. ANÁLISIS DE HAPs EN MUESTRAS DE CAFÉ EN GRANO.

Se decide aplicar el procedimiento descrito para la determinación de HAP8 a varias muestras de café en grano. Es importante destacar que, aunque en este caso el procedimiento no se ha validado específicamente, cada una de las muestras analizadas se prepara por duplicado y se realizan, en todos los casos, muestras adicionales para el cálculo de la concentración. De esta manera, se tienen resultados de precisión y exactitud para cada una de las muestras.

La descripción de las muestras analizadas se presenta en la [Tabla 163]. Como se puede observar, se dispone de un total de 10 muestras de café de 5 orígenes diferentes, 4 de tipo arábico (Costa Rica, Colombia, Brasil y Honduras) y uno de tipo robusta (India). En todos los casos, se dispone tanto del grano de café verde como del grano tostado. Estas muestras han sido proporcionadas por la empresa BOU Café S.A. de Barcelona. Esta empresa, selecciona el café verde de diferentes orígenes y realiza, en su propia fábrica, el proceso de tostado del café. Cabe destacar, que cada tipo de café tiene su propia curva de tostado. Esto permitirá comparar resultados de contenido de HAPs, antes y después del proceso de tostado.

Tabla 163. Descripción de las muestras de café en grano donde se ha analizado en contenido de HAP8.

| Origen | Estado del café | Tipo de café |
|------------|-----------------|--------------|
| Costa Rica | Verde | Arábico |
| | Tostado | |
| Honduras | Verde | Arábico |
| | Tostado | |
| Brasil | Verde | Arábico |
| | Tostado | |
| Columbia | Verde | Arábico |
| | Tostado | |
| India | Verde | Robusta |
| | Tostado | |

Todas estas muestras, han sido analizadas siguiendo el procedimiento para determinación de HAP8 en muestras de café en grano, descrito en el apartado anterior [página 383].

3.2.1.3 Resultados de las muestras de café en grano

En la [Tabla 164], se presentan los resultados individuales de cada uno de los HAP8, en las muestras de café en grano analizadas. No se incluyen los resultados correspondientes al DiBaha porque se ha detectado el pico interferente, también detectado en el caso del análisis en muestras de leche, por problema de utilizar los tapones de los viales tubo *clic* para realizar tanto la extracción líquido-líquido, como el secado del extracto orgánico con sulfato de sodio. Además, se incluye la suma de HAP4 y la suma de HAP8 (sin DiBaha). Los cálculos se han realizado por adiciones, tal y como se indica en el procedimiento descrito. En la [Figura 129], se presentan los resultados de BaP, HAP4 y HAP8 en diagramas de barras.

Tabla 164. Descripción de las muestras de café en grano donde se ha analizado en contenido de HAP8.

| Muestra | Concentración (µg/kg) | | | | | | | | |
|---------------------|-----------------------|------|------|------|----------------|-------|------|----------------|----------------|
| | BaA | Cry | BbF | BkF | BaP | BghiP | IP | HAP4 | HAP8* |
| Costa Rica -Verde | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,1 | 0,2 | 0,7 | <0,1 | 1,9 | 2,7 |
| Costa Rica -Tostado | 0,5 | 1,5 | 1,1 | 0,5 | 0,4 | 0,4 | <0,1 | 3,6 | 4,5 |
| Honduras -Verde | 0,5 | 1,5 | 1,1 | 0,5 | 0,4 | 0,4 | <0,1 | 3,6 | 4,5 |
| Honduras -Tostado | <0,1 | 3,6 | <0,1 | 0,2 | 0,1 | 1,9 | <0,1 | 3,7 | 5,9 |
| Brasil – Verde | 0,4 | 0,3 | 0,6 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | <0,1 | 1,5 | 1,8 |
| Brasil - Tostado | <0,1 | <0,1 | 0,2 | 0,2 | <0,1 | 6,4 | <0,1 | 0,2 | 6,9 |
| Colombia – Verde | 0,7 | 0,4 | 0,6 | 0,3 | 0,4 | 0,8 | <0,1 | 2,1 | 3,2 |
| Colombia - Tostado | <0,1 | 2,2 | 0,9 | 0,4 | 0,1 | <0,1 | <0,1 | 3,1 | 3,5 |
| India – Verde | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 |
| India - Tostado | <0,1 | <0,1 | 1,2 | 0,2 | 0,2 | <0,1 | <0,1 | 1,4 | 1,6 |

(*) Suma de HAP8, sin DiBaha

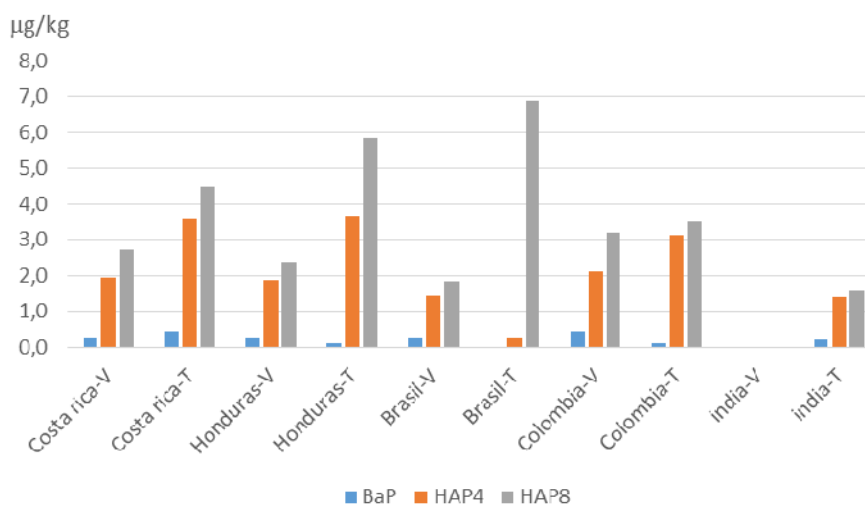


Figura 129. Resumen de los resultados de BaP, HAP4 y HAP8 en diagrama de barras, de las muestras analizadas.

Aprovechando que se han realizado adiciones en todas las muestras, se han calculado las recuperaciones [Figura 130]. Se observa que, efectivamente, es imprescindible realizar adiciones sobre las muestras ya que las recuperaciones obtenidas son bajas y variables (oscilan entre el 30% y el 60%). Aunque parece que las recuperaciones son relativamente bajas, si se tiene en cuenta el orden de concentración en que los HAPs se encuentran en las muestras ($\mu\text{g}/\text{kg}$ o ppb), la complejidad de la matriz y el procedimiento de preparación de muestra, éstas son aceptables. También se observa que el tipo de café (verde o tostado) afecta a la recuperación, obteniéndose en prácticamente todos los casos, valores más bajos para el café tostado que para el café verde (excepto para el BghiP). En cambio, los resultados de recuperación individuales para muestras del mismo tipo son equivalentes, por esta razón, se presentan los resultados de recuperación promedio.

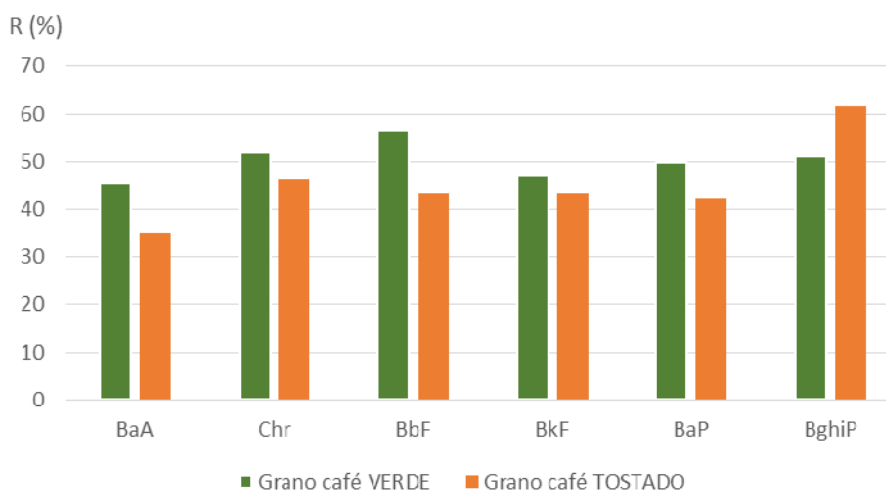


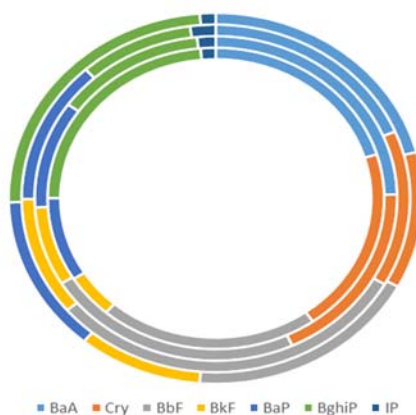
Figura 130. Resultados de recuperación promedio (R%) para cada uno de los HAPs, tanto en las muestras de café verde como en las muestras de café tostado.

Si se estudian los resultados de las muestras analizadas se puede concluir que:

- Los resultados de HAP8 en las muestras de café tostado son superiores que los que se obtiene en el café verde del mismo origen. Así se confirma la influencia del proceso de tostado en el aumento de la concentración global de HAPs en las muestras de café. Además, en el caso del café de India, único café de tipo robusta analizado, se observa que aunque en la muestra de café verde la concentración de HAPs es inferior al límite de cuantificación, después del proceso de tostado aumenta la concentración de BbF, BkF y BaP, siendo el aumento para el BbF, el más significativo
- En las muestras de café verde, el contenido de HAP8 es siempre inferior a $1 \mu\text{g}/\text{kg}$, siendo el único café de tipo robusta analizado (India) mucho más bajo que los resultados en los cafés de tipo arábico. En cambio, en los cafés tostados, algunos de los HAPs aumentan hasta valores de $6 \mu\text{g}/\text{kg}$.

- La concentración de BaP tanto en los cafés verdes como tostados es siempre inferior a 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Si se comparan los resultados de este HAP en los dos tipos de cafés se puede decir que aumenta ligeramente en las muestras de Costa Rica e India, y disminuye en las muestras de Honduras, Brasil y Colombia. Esto podría ser debido a que cada tipo de café, según su procedencia, le corresponde una curva de calentamiento (o tostado) específica.
- La concentración de HAP4 de las muestras oscila de 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en la muestra de café de India tanto verde como tostado, hasta 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en las muestras de café verde y 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en las muestras de café tostado.
- Si se calcula la relación entre la concentración de HAP4 y HAP8 de las muestras, se observa que, en todos los casos excepto en el caso del café de Brasil tostado, es igual o superior al 70%. Por lo que, igual que sucedía en el caso de las muestras de leche, se puede decir que la determinación de HAP4 sería suficiente para la descripción de esta familia de compuestos en muestras de café en grano.

En la [Figura 131] y en la [Figura 132], se presentan los porcentajes de cada uno de los HAPs, respecto a los HAP8, tanto en las muestras de café verde como en las de café tostado de los cafés de tipos arábico analizados.



*Figura 131. Porcentajes de cada uno de los HAPs en las muestras de café arábico verde.
De dentro a fuera: Costa Rica, Honduras, Brasil y Colombia*

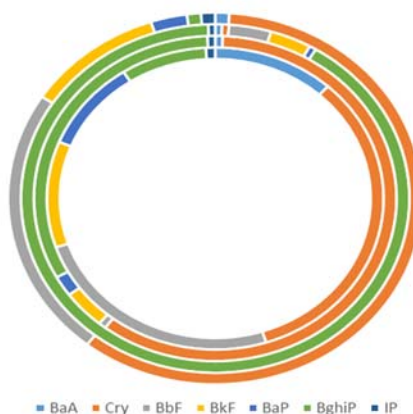


Figura 132. Porcentajes de cada uno de los HAPs en las muestras de café arábico tostado. De dentro a fuera: Costa Rica, Honduras, Brasil y Colombia

Como se puede observar en la distribución de los HAPs en las muestras de café arábico, tanto verde como tostado, se puede decir que:

- En ninguna de las muestras se detecta IP.
- La distribución de los HAPs en todas las muestras de café arábico verde, independientemente de su origen, es equivalente (20% para BaA, Cry, BbF y BghiP y del 10% para BkF y BaP), indicando que podrían proceder de la misma fuente de contaminación, seguramente de tipo ambiental. Se podría descartar el procedimiento de secado del grano, ya que, los cafés de origen Brasil utiliza el método seco, mientras que los otros (Colombia, Honduras y Costa Rica) utilizan el método húmedo, y no se observan diferencias entre ellos.
- Sin embargo, en los cafés tostados esta distribución cambia totalmente, indicando que la curva de calentamiento utilizada en cada uno de los casos es la responsable de que varíe la proporción de los diferentes HAPs. Aunque, en las muestras ensayadas se confirma que el criseno y el BghiP son los compuestos que más aumentan, BaA disminuye, el BaP, el BbF y el BkF oscilan poco.

Así, con el estudio de las muestras ensayadas se puede decir que realmente existe una contaminación de HAPs en los granos de café verde provocada por una contaminación ambiental. Además, el proceso de tostado, como era de esperar, provoca un aumento del contenido global de estos contaminantes, aunque los compuestos que más aumentan son criseno y BghiP.

*CONCLUSIONES

Capítulo I. Desarrollo de métodos cromatográficos

- Los métodos puestos a punto tanto por HPLC-FLU como por HRGC-MS (EI/SIM) como por UHPLC-FLU, permiten la determinación de los HAPs tanto de interés ambiental (16 HAPs prioritarios para la EPA) como alimentario (15 HAPs prioritarios por a la SCF). Para la separación de esta familia de compuestos, ha sido indispensable trabajar con columnas cromatográficas con fases estacionarias específicas para HAPs y con dimensiones que permitan maximizar la eficacia y la velocidad de análisis (UHPLC y Fast GC). De esta manera, se ha conseguido reducir sustancialmente el tiempo del cromatograma. Así, el tiempo de retención del IP (compuesto más pesado de los 16 prioritarios en el campo ambiental) es de unos 20 min por cromatografía de gases, de unos 11 min por cromatografía líquida convencional y de unos 4,5 min por UHPLC.
- Los métodos tanto de HPLC-FLU como de HRGC-MS (EI/SIM) tienen rangos de trabajo expresados como concentración de disolución inyectada, de 10 ng/mL a 1000 ng/mL. Sin embargo, al trabajar con sistemas de UHPLC se consigue reducir diez veces la concentración límite de trabajo y fijar el límite inferior en 1 ng/mL. Esta mejora ha sido imprescindible para poder determinar esta familia de compuestos en matrices alimentarias, donde la concentración de éstos contaminantes se encuentra del orden de los 0,01 µg/kg.

Capítulo II. Aplicación de la metodología QSRR al análisis de HAPs.

- El modelo QSRR de predicción que describe la retención de los HAPs en el sistema de HPLC, relaciona el coeficiente de retención ($\log k'$) con tres descriptores moleculares: el número de átomos de carbono, el número de anillos aromáticos con 6 átomos de carbonos y el orbital molecular ocupado de mayor energía (energía del HOMO), siendo el primero de ellos el de mayor contribución. Estos descriptores hacen referencia a la propia molécula y no consideran su interacción directa con el sistema cromatográfico. El modelo, a pesar de que ofrece un buen ajuste y una elevada capacidad de predicción altera el tiempo de retención de tres de las parejas de isómeros.
- Los descriptores escogidos para describir la separación de los HAPs por HPLC también son aplicables cuando estos compuestos se separan por cromatografía de gases. Aunque por HRGC, la importancia relativa del descriptor correspondiente al número de átomos de carbono aumenta hasta el 95%, en detrimento de los otros dos descriptores. Esto dificulta la asignación de los valores de $\log k'$ para los isómeros, disminuyendo la capacidad de predicción para estos compuestos.
- Cuando el modelo se aplica a la familia de compuestos nitro-HAPs (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos con un grupo nitro en su estructura), los tres descriptores que describen la separación de los HAPs por cromatografía de gases son insuficientes y se debe incorporar un nuevo descriptor en el modelo, el momento dipolar. De esta manera, se consigue mejorar el modelo de ajuste y diferenciar entre isómeros de posición del grupo nitro.

Capítulo III. Determinación de HAPs en muestras de aire ambiente.

- La extracción de los HAPs mediante el sistema de extracción acelerada con solvente (ASE) en filtros de partículas PM10, proporciona resultados equivalentes a los métodos de extracción convencionales (ultrasonidos y Soxhlet), pero se consigue una clara disminución en el tiempo de extracción por muestra y un ahorro de disolvente, que permiten aumentar, de forma significativa, la productividad en relación a este tipo de análisis.
- Trabajar con el detector de fluorescencia con dobles parejas de longitudes de onda (excitación/emisión) para cada uno de los analitos de estudio, ha permitido eliminar la etapa de purificación de muestra. De esta manera, se consigue una confirmación de la identificación de los compuestos, equivalente a la que se tendría con el detector espectrómetro de masas. Es decir, los picos se identifican tanto por coincidencia de tiempos de retención como por la relación de respuestas a las dos parejas de longitudes de onda escogidas.
- Los resultados obtenidos en la validación, permiten garantizar la adecuación del procedimiento desarrollado para la determinación de HAPs en muestras de aire ambiente, y además, han permitido estimar la incertidumbre de los resultados (requisito indispensable de la norma ISO 17025:2005), de forma rápida y sencilla.
- Los controles establecidos en el procedimiento analítico (IQS-CROMA PNT-A-0079), permiten garantizar la calidad de los resultados obtenidos en largas series de muestras. Además, dichos controles, permiten cumplir holgadamente los requisitos de calidad incluidos en la norma de referencia UNE-EN 15549:2008.
- El análisis de las muestras de aire ambiente de la XVPCA ha permitido comprobar que no existe una relación directa entre la concentración en el aire de las partículas capturadas en el filtro PM10 y la concentración de HAPs, ya que estos compuestos no son igualmente afines a todas las partículas de este tamaño aerodinámico presentes en el aire. Sin embargo, sí que se ha podido observar una tendencia estacional de la concentración de los HAPs, que en los meses de más frío es siempre mayor que en los meses de calor. Esto se debe a que en invierno existe una mayor emisión de estos contaminantes por fuentes antropogénicas y aumentan los fenómenos de inversión térmica.

Capítulo IV. Determinación de HAPs en matrices alimentarias: leche y café.

Con relación a los procedimientos desarrollados para la determinación de HAPs en matrices alimentarias se concluye que:

- El procedimiento puesto a punto y validado para la determinación de HAP8 (BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DiBahA, BghiP e IP) en muestras de leche, permite la cuantificación de estos contaminantes a una concentración de hasta 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$, es decir, a un nivel 100 veces inferior al valor legislado para el benzo(a)pireno en muestras de leche para lactantes o de continuidad.
- En lo que hace referencia a las muestras analizadas tanto de café verde como tostado, de tipo Arábico y Robusta, se puede decir que su concentración de BaP es siempre inferior a 1

$\mu\text{g}/\text{kg}$. Sin embargo, se ha comprobado que las muestras de café verde siempre tienen un contenido de HAP8 inferior a las muestras de café tostado, indicando que el procesado incrementa la presencia de estos contaminantes en este tipo de muestras.

- En más del 60% de las muestras de leche analizadas, el grupo de HAP4 (BaA, Cry, BbF, y BaP) es suficiente para describir adecuadamente esta familia de compuestos. Sin embargo, en el caso de las muestras de café considerar todo el grupo de HAP8 es imprescindible si se quieren ver las diferencias entre café verde y tostado

*BIBLIOGRAFIA

1. CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- Web oficial de National Center for Biotechnology Information.* (2013). Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- WHO (World Health Organization). (1998). *Environmental health criteria for selected non-heterocyclic aromatic hydrocarbons*. Obtenido de International Programme on Chemical Safety.
- A.S. Group, R.Assessment and C. Management. (2006). "Initial Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Feed (materials). vol. 31.
- Agilent. (2010). Agilent 2257 J&W Select PAH Column. *Ficha de datos-Agilent Technologies*.
- Agilent Technologies.* (2015). Obtenido de <https://www.agilent.com/en-us/products/liquid-chromatography/lc-columns/small-molecule-separations>
- Agudo, A. (2010). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Acercamiento a su problemática como riesgo laboral. *España*.
- Albinet, A., Leoz-Garziandia, E., Budzinski, H., Villenave, E., & Jaffrezo, J. (2008). Nitrated and oxygenated derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air of two French alpine valleys. *Atmospheric Environment* 42, 55-64.
- Alexander, J., Benford, D., Cockburn, A., Cravedi, J., & Dogliotti, E. (2008). *Polycycloc Aromatic Hydrocarbons in food. Scientific Opinion of the panel on contaminants in the food Chain*.
- Al-Kindya, S., & Miller, J. (2008). High-performance liquid chromatography determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons by indirect fluorescence detection. *Biomedical Chromatography*.
- Arqués i Boté, J. F. (2006). *Hidrocarburs aromatics policíclics en els aliments*. Obtenido de http://www-aspb.es/quefem/docs/hidrocarburs_aromatics.pdf
- ASPCAT, Agilent, & UB, D. Q. (2012). Determination of 24 PAHs in drinking water. *Agilent Application Note*.
- ATSDR. (1995). *Toxicological profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services*. Atlanta. Obtenido de <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.pdf>
- ATSDR. (Agosto de 2015). *Agency for Toxic Substances & Disease Registry*. . Obtenido de Substances Priority List (SPL). Resource Page: <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/resources/>
- Baggiani, C., Anfossi, L., Baravalle, P., Giovannoli, C., & Giraudi, G. (2007). Molecular recognition of polycyclic aromatic hydrocarbons by pyrene-imprinted microsphere. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389 (2), 413-422.

- Bagó, B. (2005). *Análisis de diversos contaminantes orgánicos en fangos de depuradora i estudio de su evolución en procesos de post-tratamiento*. Barcelona: IQS. Tesis Doctoral.
- Baird, C. (2001). *Química Ambiental (ISBN: 84-291-7902-X)*. Barcelona: Reverté S.A.
- Bamford, H., Bezabeh, D., Schantz, M., Wise, S., & Baker, J. (2003). Determination and comparison of nitrated-polycyclic aromatic hydrocarbons measured in air and diesel particulate reference materials. *Chemosphere*, 575-587.
- Barrado Olmedo, A. (2013). *Estudio sobre la determinación de compuestos aromáticos policíclicos en aire ambiente mediante cromatografía líquida de alta resolución y caracterización anual en el área de Madrid*. Madrid: Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid.
- Barrado Olmedo, A. I. (2013). *Estudio sobre la determinación de compuestos aromáticos policíclicos en aire ambiente mediante cromatografía líquida de alta resolución y caracterización anual en el área de Madrid*. Madrid: Universidad Complutense.
- Benventuri, M. E. (s.f.). The science of Acquity UPLC applied to environmental analyses of PAHs and explosives in water. *Application Note-Waters*.
- BOE nº317. (30/12/2010). *Real Decreto 1716/2010, por el que se modifica el Real Decreto 308/1983 del 25 de Enero, que aprueba la Reglamentación Técnico-sanitaria de Aceites Vegetales comestibles*. BOE.
- C. Crépineau, G. R. (2003). Contamination of pastures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the vicinity of a highway. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 16, 4841–5.
- Café de Colombia®, " El arbol y el entorno ". (s.f.). Obtenido de http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/sobre_el_cafe/el_cafe/el_arbol_y_el_entorno
- CEN/TC 264/WG 21 N 127. (2006). *Air quality- Standard method for the measurement of the concentration of benzo(a)pyrene in ambient air*. European standard method.
- Cirera i Domenech, E. (2013). *Tesis doctoral-Instituto Químico de Sarrià-Universidad Ramon Llull*. Barcelona: IQS.
- Collantes, E., Tong, W., Welsh, W., & Zielinski, W. (1996). Use of moment of inertia in comparative molecular field analysis to model chromatographic retention of nonpolar solutes. *Analytical chemistry*, 68 (13), 2038-2043.
- Connell, D. (2005). Basic concepts of environmental Chemistry. En B. R. etc.. Taylor&Francis.
- Cvacka, J., Barek, J., Fogg, A., Moreira, J., & Zima, J. (1998). High-performance liquid chromatography of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analyst* 123, 9R-18R.
- D.W. Connell, D. H. (1997). *Basic Concepts of Environmental Chemistry*, . Lewis Publishers, Boca Ratón, .

- Directiva 2004/107/EC. (s.f.). *del Parlamento Europeo y del Congreso del 15 de diciembre de 2004 relativa "arsénico, cadmio, mercurio, níquel y los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el aire ambiente"*.
- Directiva 2015/1480. (s.f.). *de 28 de agosto de 2015, por la que se modifican varios anexos de las Directivas 2004/107/CE y 2008/50/CE del Parlamento*.
- Duchowicz, P., Bucknum, M., & Castro, E. (2007). New molecular descriptors based upon the Euler equations for chemical graphs. *Journal of mathematical chemistry*, 41 (2), 193-208.
- EC. (2001). *Ambient air pollution by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Position paper*. Luxemburg. Obtenido de http://www.ec.europa.eu/environment/air/pdf/pp_pah.pdf
- Edlund, S. (2004). *PAHs as POPs. Possibilities, implications and appropriateness of regulatins global emissions of PAHs through the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants*.
- EFSA. (2007). *Finding of EFSA Data Collection on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food*. EFSA/DATEX/002 (revision 1).
- EFSA, E. F. (2008). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain*. EFSA Journal (2008).
- EPA/625/R-96/010b. (1999). *Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Ambient Air Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). Compendium of methods for the Determination of Toxic Organic Compounds in Ambient Air (Second Edition)*. Cincinnati: US Environmental Protection Agency.
- ES ISO 15753: 2012. (s.f.). *Animal and vegetable fats and oils. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons*.
- EU_BREFs. (2009). *Guidance document on Best Available Techniques to control de emissions of Persistent Organic Pollutants from major Stationary Sources*. Referencia: ECE/EB.AIR/2009/14.
- F. W. Agent. (2008). Ciba® TINOPAL® OB. 1-2.
- FDA. ([Accessed: 17/10/2015] de 2009). *PMO (Pasteurized Milk Ordinance*. Obtenido de <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM291757.pdf>
- Frazier, R. (2009). *Food chemistry, vol. 107 n°1*.
- FSA, F. S. (2009). *Polycyclic Aromatic hydrocarbons in food*. Ireland: Toxology Factsheet series.
- Gallego-Fernandez. (2011). Generalidades del citocromo P450. Aspectos fundamentales. *Colección Docencia Universitaria*.

- Garcia Falcon, M. (2005). Minimal clean-up and rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in instant coffee. *Food Chemistry*, 90 (4), 643-647. doi:10.1016/j.foodchem.2004.03.059
- Gotor, G., Blanco, M., & Broto-Puig, F. (2008). *Cálculo de la incertidumbre asociada a los resultados basados en la validación de un procedimiento de análisis*. Barcelona: IQS.
- Hall, L., & Kier, L. (1991). The molecular connectivity Chi Indices and kappa shape Indices in Structure-property Modeling. *Reviews of Computational Chemistry 2^o*.
- Harris, D. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. Barcelona: Reverté.
- Heijnsdijk, P. (2010). GC Analysis of PAHs using an Agilent J&W FactorFour VF-17MS Column with EZ-Guard. *Agilent Technologies-Application Note*.
- IARC. (1983). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1. Chemical, Environmental and Experimental Data. Lyon, France.
- IARC. (1987). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical Humans. Overall Evaluations of Carcinogenicity. Supplement 7. Lyon, France.
- IARC. (24 de August de 2015). *Monographs on the evaluation of Carcinogenic risks to humans*. Obtenido de Agents classified by IARC Monographs, Volumes 1-113: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>
- IARC, W. G. (2010). *IARC monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol 92. Some Non-heterocyclic Aromatic Hydrocarbons and some related exposures*. Lyon, France.
- Illy, A., & Viani, R. (1995). *Espresso coffe: The chemistry of Quality*". Academic Press INC.
- Inc. Chemical Computing Group. (V. 2010.10 (2010)). Molecular Operating Environment (MOE).
- Institut national Agronomique Paris-Grignon & Inra U.M.R.I. (2006). *Investigation of sample of treatment steps for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in ground coffee*. Paris-Grignon.
- Ireland, F. s. (2009). *Polycyclic aromatic hydrocarbons in food. Toxicology Factsheet series*.
- IUPAC. (1998). Nomenclature of fused and bridged fused rings systems. *Pure & Appl. Chem. Vol 70 nº1*, 143-216.
- Judson, R. (1997). Genetic algorithms and their use in chemistry. *Reviews in computational chemistry*, 10, 1-74.
- Kaliszan, R. (1987). Quantitative structure-chromatographic retention relationships.
- Kazakevich, Y. (2014). *Band broadening theory (Van Deemter equation)*. Setona H.U.

- Kielhorn, J., Wahnschaffe, U., & Mangelsdorf, I. (s.f.). Selected nitro- and nitro-oxy-polycyclic aromatic hydrocarbons. *Fraunhofer Institute of Toxicology and Aerosol Research. Environmental Health Criteria* 229.
- Krull, I., & Swattz, M. (1998). Determining limits of detection and quantification analytical methods. *LC/GC*.
- Lerda, D. (2011). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Factsheet (4th Edition)*. Belgica: EU. Obtenido de http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/sampling_en.htm
- Lippa, A., Sander, L., & Wise, S. (2004). Chemometric studies of polycyclic aromatic hydrocarbon shape selectivity in reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica acta* 523 (4), 259-267.
- Liu, L. et al. (2007). Development of analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulates. *Journal of Environmental Science* 19, 1-11.
- LookChem. Search Chemicals*. (2008-2012). Obtenido de <http://www.lookchem.com>
- Luque, R. G. (2011). *Química general par ciencias ambientales*. Valencia: Colección Educació Lab de materiales (PUV-Universidad de Valencia).
- Lynam, A. K. (2012). PAH Analyses with High Efficiency Gc columns: Column Selection and Best Practises. *Agilent Technologies - Application Note*.
- M- DJ and B. RJ. (1984). Enzymic coagulation of casein micelles: A review. *J. Dairy Science*, vol 67 (5), 919-929.
- M. Buffa, G. M. (2009). Applied and Interdisciplinary Physycs. *NLN Anual Repors*, 129-130. doi:DOI: 10.4229/24thEUPVSEC2009-1DV.4.28.
- M. Quintela, J. Báguena, G. Gotor, M.J. Blanco, F. (2011). Estimation of the uncertainty associated with the results based on the validation of chromatographic analysis procedures: Application to the determination of chlorides by high performance liquid chromatography and of fatty acids by high resolution gas chr. *Journal of Chromatography A*.
- Mejía, G. (2005). *Estudio de la evolución de la materia orgánica en procesos de compostaje y secado térmico en fangos de depuradora*. Barcelona: IQS_Tesis Doctoral.
- Miet, K., Le Menach, K., Flaud, P.-M., & Budzin, H. (2009). Heterogeneous reactivity of pyrene and 1-nitropyrene with NO₂: Kinetics, product yields and mechanism. *Atmospheric Environment* 43, 837-843.
- Ministerio de Agricultura, A. y. (2013). *Análisis de la Calidad del Aire en España. Evolución 2001-2012*.

- Moret, S., Purcaro, G., & Conte, L. (2008). RapidSPE–HPLC. Determination of the 16 European priority polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oils. *Journal of Separation Science*, *31*, 3936-3944.
- MTA/MA-039/A00. (s.f.). Determinación de HAPs en aire. Método de captación en filtro y tubo de adsorbente y detección fluorimétrica/cromatografía líquida de alta resolución. *Método aceptado por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT)*. España.
- N. Grova, C. L. (2000). European Journal of Mass Spectrometry 2000 Nathalie Grova . vol. 460, 457–460.
- NCBI. (2014). *Web oficial "National Center for Biotechnology". Information (categoría: Pubchem Substance)*. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Orecchio, S., Ciotti, V., & Culotta, L. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coffee brew samples: analytical method by GC-MS, profile, levels and sources. *Food and Chemical Toxicology: An international Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* *47* (4), 819-26. doi:10.1016/j.fct.2009.01.011
- P. L and F. HM. (1982). Interactions leading to formation of casein submicelles. *J. Dairy Science*, vol 65 (12), 2259-2266.
- Productos de origen animal o vegetal, o sus mezclas. Joint Research Center.* (2006). Obtenido de UE 2, 1-17: http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/alimento/1-TCAC_JS_Generalidades_aceites_comestibles.pdf
- Propiedades de los hidrocarburos. Enciclopedia de la Salud y Seguridad en el Trabajo.* (s.f.).
- Quiñones, L., Lee, K., Varela, N., Escala, M., Garcia, K., & Godoy, L. (2006). Cancer pharmacogenetics: Study of genetically determined variations on cancer susceptibility due to xenobiotic exposure. *Revista médica de Chile*, *134*, 499-515.
- R. Ce, N. Del, P. Europeo, and Y. D. E. L. Consejo, "Commission regulation (EU) No 1881/2006. (2007). vol 16 , 1–68.
- Rahman, A., & Al Deyab, S. (2011). Transition metal catalyzed/NaBH₄/MeOH reduction of nitro, carbonyl, aromatics to hydrogenated products at room temperature. *International Journal of Advances in Engineering & Technology*.
- Real Decreto 102/2011. (s.f.). *del 28 de enero de 2011, relativo a la mejora de la calidad del aire*.
- Real Decreto 640/2006. (s.f.). *por el que se regulan determinadas condiciones de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene, de la producción y comercialización de los productos alimenticios*. Obtenido de <http://www.boe.es/boe/dias/2006/05/27/pdfs/A19999-20002.pdf>.
- Real Decreto 812/2007. (s.f.). *Control de la calidad del aire ambiente en relación con el As, Cd, Hg, Ni y los hidrocarburos aromáticos policíclicos*.

- Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes de España.* (2015). Obtenido de Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente: <http://www.prtr-es.es/Particulas-PM10,15673,11,2007.html>
- Roos, P., Tschirbs, S., Pfeifer, F., Welge, P., & Hack, A. (2004). *Toxicology*, 205, 181-194.
- SCF. (2002). *Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food.* Bruselas: European Commission (Health and Consumer protection directorate-general). Obtenido de http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.html
- Scientific, C. (2013). *Agilent Technologies, product information, HPLC columns.* Obtenido de http://www.crawfordscientific.com/ZORBAX_StableBond_HPLC_Columns.htm
- Shimin, W., & Wenjuan, Y. (2012). Líquid-liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in four different edible oils in China. *Analytical Methods. Food Chemistry. Vol 134*, 597-601.
- Steward, J. (1993). *MOPAC manual (Seventh Edition).*
- Supelco: App. Note 193. (s.f.). Extraction & Analysis of PAHs in Olive Oil using SupelMIP SPE-PAHs and GC-MS. *Supelco analytical.*
- Tejedor-Estrada, R. (2011). *Tesis doctoral, Insituto Químico de Sarrià-Universidad Ramon Llull.* Barcelona: IQS.
- Terfloth, L., & Gasteiger, J. (2001). Neural networks and genetic algorithms in drug design. *Drug Discovery Today*, 6, 102-108.
- Todeschini, R., & Consonni, V. (2008). *Handbook of Molecular Descriptors.* Wiley-VCH (Alemania).
- Tosoh Bioscience LLC: The Chemistry of Innovation. Technical suport.* (s.f.). Obtenido de What is the difference between a monomeric and polymeric C18 bonded phase?: <http://www.separations.us.tosohbioscience.com/ServiceSupport/TechSupport/ResourceCenter/FAQs/HPLCColumns/ReversedPhase/#FAQRP3>
- UN. (2001). *United Nations Convention on Persistent Organic Pollutants. Annex D.* Stockholm.
- UNE16362. (2006).
- UNE-EN-ISO 1042. (1998). *Laboratory glassware -- One-mark volumetric flasks.*
- Varian. (s.f.). *Gas Chromatography - Varian columns.*
- Vives, I., Grimalt, J.O. i Guitart R. (2001). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana. *Asociación para el Avance de la Ciencia y la Tecnología en España (AACTE).*
- Waters. (2007). Transferencia de métodos HPLC a UPLC: Revisión de aspectos clave y herramientas disponibles. Barcelona.

- Waters. (s.f.). *Guía del Sistema ACQUITY UPLC H-Class (Revisión A)*. Obtenido de http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/acquity_h-class_bio_system_guide_ra_es.pdf
- Waters, S. Grumbach, E., C. Arsenault, J., & R. McCabe, D. (2009). *Beginners Guide to UPLC (Ultra-Performance Liquid Chromatography)*. Milford: Waters Corporation.
- WHO. (1998). *Environmental Health Criteria 202. Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons*. Ginebra: United Nations Environmental Programme. Obtenido de United Nations.
- WHO. (2000). *Air quality guidelines for Europe. European series nº 91*. Obtenido de <http://www.euro.who.int/document/e71922.pdf>
- Wildman, S., & Crippen, G. (1999). Prediction of physiochemical parameters by atomic contributions. *J. Chem. Inf, Comput. Sci*, 39 (5), 868-873.
- Wilson, W. (2014). *Novel developments on the extraction and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples*. Florida: PhD thesis.
- Working group on PAH. (2001). *Ambient air pollution by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH). Position paper*. Luxemburg: Office for official publications of the European Communities.
- Zhang, Y., Yang, B., Gan, J., Liu, C., & Shu, X. (2011). Nitration of particle-associated PAHs and their derivatives(nitro-, oxy-, and hydroxy-PAHs) with NO₃ radicals. *Atmospheric Environment* 45, 2515-2521.

2. PUBLICACIONES Y POSTERS

Publicaciones relacionadas con la presente Tesis Doctoral:

Báguena, J.; Gotor, G.; Broto, F.; Blanco, M.J. (2008). Cálculo de la incertidumbre asociada a los resultados, basado en la validación de un procedimiento de análisis. Aplicación en la determinación de cloruros por HPLC en lixiviados. *Afinidad* 65, 11-19.

Pereira, T.; Gotor, G.; Beltrami, L.; Nolla, C.; Rocha J.; Broto F.; Comellas Ll.; Vargas V. (2010). Salmonella mutagenicity assessment of airborne particulate matter collected from urban areas of Rio Grande do Sul State, Brazil, differing in anthropogenic influences and polycyclic aromatic hydrocarbon levels. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 72-1, 78-85.

Quintela M., Báguena J., Gotor G., Blanco M.J., Broto F. (2011) Estimation of the uncertainty associated with the results based on the validation of chromatographic analysis procedures: Application to the determination of chlorides by high performance liquid chromatography and of fatty acids by high-resolution gas chromatography. *Journal of Chromatography A*

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos:

C. Nolla, G. Gotor, C. Ribas, L. Comellas, F. Broto-Puig (2008). Procedimiento para la determinación de Hidrocarburos aromáticos policíclicos en filtros de captación de partículas PM10. Poster, *XIls Jornadas de Análisis Instrumental*, Barcelona.

G. Gotor, C. Nolla, F. Broto-Puig, J. Báguena, M.J. Blanco, C. Ribas (2011). Determinación de HAPs por ASE-HPLC-fluorescencia en filtros de captación de partículas PM10. Estimación de la incertidumbre. Poster, *XIII Jornadas de Análisis Instrumental*, Barcelona.

J. Dulsat, G. Gotor, R. Estrada, F. Broto-Puig (2014). Understanding the behavior of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in HPLC-UV by means of QSRR. Poster, *XIVs Jornadas de Análisis Instrumental*, Barcelona.

M. Guillem, G. Gotor, F. Broto-Puig (2014). Determination of PAHs in edible oil samples using HPLC-FLU. Poster, *XIVs Jornadas de Análisis Instrumental*, Barcelona.

D. Garcia-Borras, G. Gotor, F. Broto-Puig (2014). Chromatographic method to analyze non-volatile PAHs by HRGC/MS (EI/SIM). Poster, *XIVs Jornadas de Análisis Instrumental*, Barcelona.

A. Bagó, G. Gotor, C- Ribas, F. Broto-Puig (2014). Determination of NPAHs in ambient air. Comparison of chromatographic methods (HPLC-FLU vs. HRGC-MS). Poster, *XIVs Jornadas de Análisis Instrumental*, Barcelona.

D. García-Borras, G. Gotor, J. Lliberia, J. Díaz, F. Broto-Puig (2015). *Polycyclic aromatic hydrocarbons analysis in commercial and raw milk by UHPLC-FLU*. Poster, *XV Reunión Científica de la SECyTA*, Castellón de la Plana.

*ANEXO

ANEXO 1. Resultados de BaP, HAP4 y HAP8 de las muestras de leche cruda analizadas.

| Id | Provincia | Comarca | [HAPs] / µg/kg | | |
|----|-----------|--------------------|----------------|--------|--------|
| | | | [BaP] | [HAP4] | [HAP8] |
| 1 | Barcelona | Alt Penedès | <0,01 | 0,05 | 0,09 |
| 2 | Barcelona | Alt Penedès | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 3 | Barcelona | Baix Llobregat | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 4 | Barcelona | Barcelonès | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 5 | Barcelona | Berguedà | <0,01 | 0,17 | 0,18 |
| 6 | Barcelona | Maresme | 0,03 | 0,16 | 0,31 |
| 7 | Barcelona | Maresme | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 8 | Barcelona | Maresme | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 9 | Barcelona | Maresme | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 10 | Barcelona | Osona | <0,01 | 0,3 | 0,34 |
| 11 | Barcelona | Osona | <0,01 | 1,24 | 1,24 |
| 12 | Barcelona | Osona | <0,01 | 0,5 | 0,51 |
| 13 | Barcelona | Osona | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 14 | Barcelona | Osona | 0,01 | 0,05 | <0,08 |
| 15 | Barcelona | Osona | <0,01 | 0,06 | <0,08 |
| 16 | Barcelona | Vallès Oriental | <0,01 | 0,37 | 0,4 |
| 17 | Barcelona | Vallès Oriental | 0,01 | 0,09 | 0,19 |
| 1 | Girona | Alt Empordà | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 2 | Girona | Alt Empordà | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 3 | Girona | Alt Empordà | <0,01 | 0,05 | <0,08 |
| 4 | Girona | Alt Penedès | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 5 | Girona | Alt Penedès | <0,01 | 0,07 | 0,09 |
| 6 | Girona | Baix Empordà | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 7 | Girona | Baix Empordà | 0,02 | 0,11 | 0,16 |
| 8 | Girona | Baix Empordà | <0,01 | 0,07 | 0,08 |
| 9 | Girona | Baix Empordà | <0,01 | <0,04 | 0,78 |
| 10 | Girona | El Pla de l'Estany | 0,02 | 0,06 | <0,08 |
| 11 | Girona | El Pla de l'Estany | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 12 | Girona | El Pla de l'Estany | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 13 | Girona | El Pla de l'Estany | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 14 | Girona | Garrotxa | <0,01 | 0,16 | 0,17 |
| 15 | Girona | Garrotxa | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 16 | Girona | Garrotxa | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 17 | Girona | Garrotxa | 0,01 | 0,06 | 0,1 |
| 18 | Girona | Gironès | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 19 | Girona | Gironès | 0,01 | 0,06 | <0,08 |
| 20 | Girona | Gironès | <0,01 | 0,1 | 0,11 |
| 21 | Girona | Gironès | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 22 | Girona | Gironès | <0,01 | 0,29 | 0,29 |
| 23 | Girona | La Selva | 0,02 | 0,14 | 0,24 |
| 24 | Girona | Ripollès | <0,01 | <0,04 | <0,08 |

| Id | Província | Comarca | [HAPs] / µg/kg | | |
|----|-----------|--------------|----------------|--------|--------|
| | | | [BaP] | [HAP4] | [HAP8] |
| 25 | Girona | Ripollès | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 26 | Girona | Ripollès | <0,01 | 0,06 | <0,08 |
| 27 | Girona | Ripollès | 0,01 | 0,05 | <0,08 |
| 28 | Girona | Ripollès | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 29 | Girona | Selva, la | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 30 | Girona | Selva, la | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 31 | Girona | Selva, la | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 32 | Girona | Selva, la | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 1 | Lleida | Alt Urgell | 0,03 | 0,43 | 0,54 |
| 2 | Lleida | Alt Urgell | 0,01 | 0,05 | 0,09 |
| 3 | Lleida | Cerdanya | 0,01 | 0,1 | 0,16 |
| 4 | Lleida | Noguera | 0,02 | 0,11 | 0,16 |
| 5 | Lleida | Noguera | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 6 | Lleida | Noguera | <0,01 | 0,15 | 0,15 |
| 7 | Lleida | Noguera | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 8 | Lleida | Pla d'Urgell | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 9 | Lleida | Pla d'Urgell | <0,01 | 0,56 | 0,64 |
| 10 | Lleida | Segrià | <0,01 | 0,08 | 0,08 |
| 11 | Lleida | Segrià | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 12 | Lleida | Solsonès | <0,01 | <0,04 | <0,08 |
| 13 | Lleida | Solsonès | <0,01 | <0,04 | <0,08 |