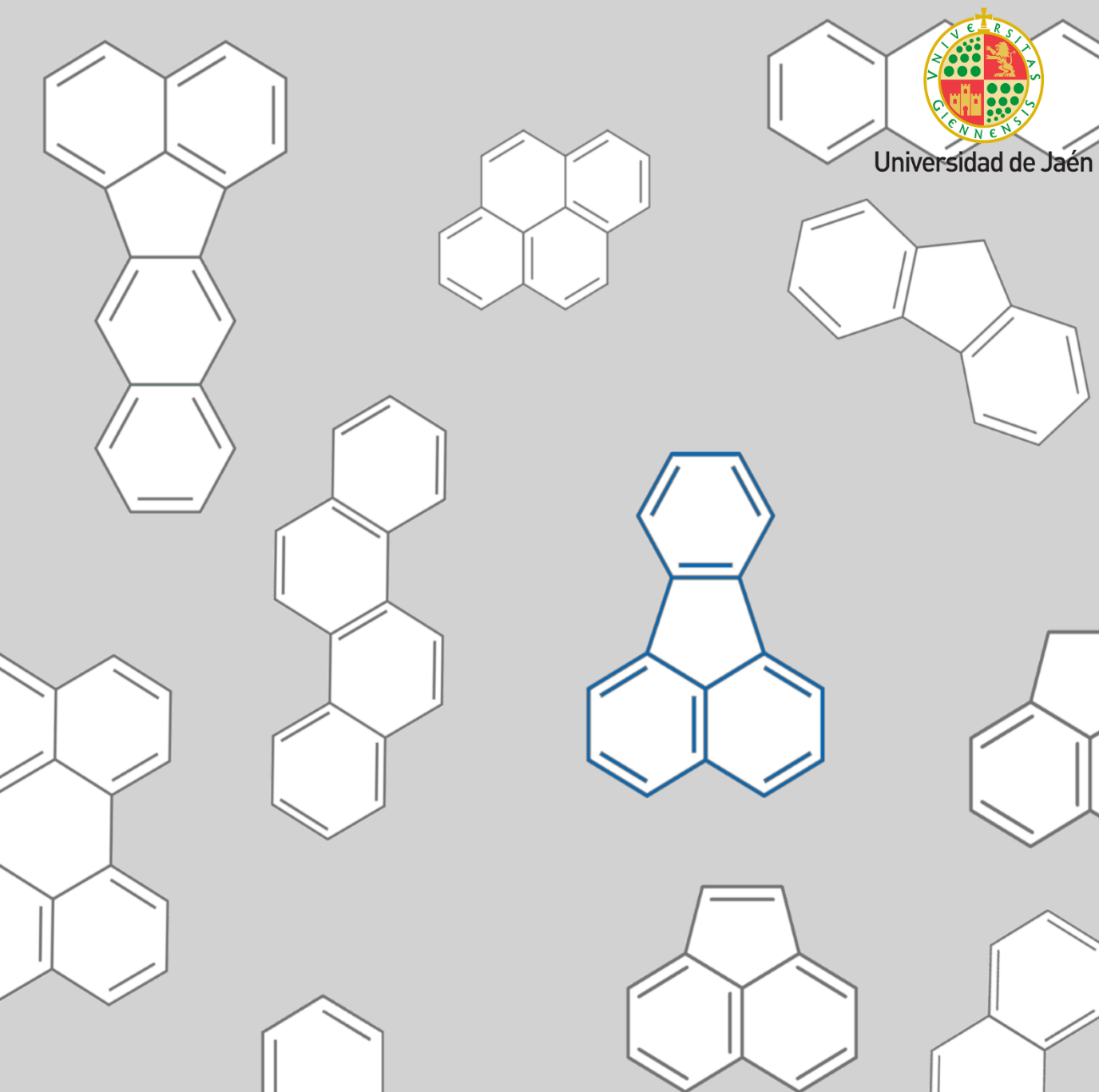




Universidad de Jaén



# NUEVAS ESTRATEGIAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EN MUESTRAS AGROALIMENTARIAS Y AMBIENTALES

**TESIS DOCTORAL**

**Seguridad de los Alimentos**

Andrés Jesús Rascón López

Departamento de Química Física y Analítica

Universidad de Jaén

Jaén, 2018





**UNIVERSIDAD DE JAÉN**

**Departamento de Química Física y Analítica**

**Área de Química Analítica**

**NUEVAS ESTRATEGIAS ANALÍTICAS PARA  
LA DETERMINACIÓN DE  
HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS  
AROMÁTICOS EN MUESTRAS  
AGROALIMENTARIAS Y AMBIENTALES**

Andrés Jesús Rascón López

Jaén, 2018



NUEVAS ESTRATEGIAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE  
HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EN MUESTRAS  
AGROALIMENTARIAS Y AMBIENTALES.

El Director

Fdo. : Dr. Evaristo Antonio Ballesteros Tribaldo

Catedrático de Universidad

**Memoria presentada para aspirar al Grado de**

**Doctor por la Universidad de Jaén**

Andrés Jesús Rascón López

Jaén, 2018

Fdo.: Andrés Jesús Rascón López



D. Evaristo Antonio Ballesteros Tribaldo, Catedrático de Universidad, del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Jaén, en calidad de Director de la Tesis Doctoral presentada por el Titulado D. Andrés Jesús Rascón López

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral “Nuevas estrategias analíticas para la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos en muestras agroalimentarias y ambientales” ha sido desarrollada totalmente en el laboratorio del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Jaén y que, a su juicio, reúne todos los requisitos exigidos a este tipo de trabajo.

Y para que conste y surta efectos pertinentes, expiden el presente certificado en la ciudad de Linares a 5 de Junio de 2018.

Evaristo Antonio Ballesteros Tribaldo



## Agradecimientos

Cuando uno entra en el mundo de la investigación y hace una Tesis no sólo se implica a sí mismo, todo su alrededor se ve afectado de alguna manera y, aunque muchas veces no se puede llegar a entender ciertos momentos por los que uno pasa, están ahí demostrando su apoyo incondicional.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis padres y mi hermano porque sin ellos esto no existiría, me habéis dado el soporte para poder trabajar, habéis aguantado lo bueno y lo malo que este trabajo ha conllevado y siempre habéis estado ahí. También mencionar a mi tío Andrés, y mis abuelas, gracias a todos.

A Evaristo Ballesteros por haberme dado la oportunidad de realizar esta Tesis, de haber puesto todo a mi disposición y haberme enseñado no sólo sobre la química analítica, también a crecer como persona y a desenvolverme en la vida. Hemos tenido de todo, incluidos los viajes que nos hemos dado a urgencias de vez en cuando, porque se ve que tranquilos no podemos estar ni un rato. Ahora se ve con humor, pero gracias por todo lo de aquel día.

A todos los que han ido pasando por el laboratorio durante este tiempo. Monaim, por explicarme y ayudarme en los comienzos, cuando uno llega a un laboratorio y se encuentra delante del problema siempre es de ayuda encontrar a alguien que te eche una mano. Antonio Ortiz, me llevo a un gran amigo y un máster en montar y desmontar el masas, voy a echar de menos las visitas a tu laboratorio a quejarme de la vida. Al resto de personas que han pasado por aquí: Fátima, Mamen, Safae y Pilar, gracias por todo. Laura, has llegado la última, pero voy a echar de menos los cafés de las 11, que lo sepas.

Porque en esta Tesis ha habido un poquito de todo, estrés, risas, accidentes varios y mucho trabajo, pero lo que nunca ha faltado ha sido el café.

A mis compañeros del Grupo de Investigación FQM-323, Antonio, Bienve, David, Jaime, Robles, Juan Francisco, Felipe, Mamen y Delia, aunque estaba aquí en Linares siempre que he necesitado algo habéis estado ahí y me habéis prestado apoyo, muchas gracias.

A mis amigos, también podríamos decir que han sido mis proveedores oficiales de muestras, quien tiene un amigo tiene una Tesis.

Ana, probablemente nadie mejor que tú sabe lo que esto ha sido, has estado conmigo apoyándome y llevándome al Elviris cuando la situación lo pedía. Además, me has dado un sobrino postizo que es un primor, ya sabes que para mí eres parte de mi familia. Me conoces y sabes que para mí escribir esto no es fácil, pero no sé qué habría sido de todo esto sin tenerte a mi lado. Quedan

muchos momentos aquí guardados: lloros y lamentos en clase de *core* como buenos deportistas de bajo presupuesto que somos, o pasando 13 horas en un aeropuerto y casi perdiendo la cabeza (más) y acabar con salsa hasta los codos por comer alitas de pollo. Por cierto, sigo queriendo un monopatín como los que llevaban esos niños.

Marisa y Natalia, son muchos años ya desde que nos conocemos, gracias por haberme acompañado durante este tiempo y por haberme traído tantas muestras de todos lados, un trocito de este trabajo también es vuestro. Por muchos más años de pasarlo bien y aguantarnos. Por cierto, ¿seguirá la señora de aquella esquina con cara de sorpresa y terror?

Laura, Yolanda y Sara, siempre estáis ahí cuando se os necesita, a pesar de nuestros *éxitos de convocatoria* para quedar, ha habido mejores y peores momentos, pero ahí seguimos en nuestra sede, yo tomándome 4 cafés en lo que vosotras pedís cosas extrañas, o simplemente muriendo en el gimnasio. Patricia, siempre estarás presente en este trabajo, me diste ánimo y fuerza para seguir, cuidaremos bien de la peque. Laura de la Coba, Esther y Lidia, ahora estamos muy lejos, pero lo importante sigue ahí, no sabéis lo que echo de menos ciertas cosas.

José Carlos, qué sería de nosotros sin quejarnos amargamente sobre lo que pasa en los laboratorios, siento decepcionarte, pero no defiendo la Tesis en Suecia y me quedo sin espada, ya sabes que habría sido todo un espectáculo.

Carlos, al final he escrito mi libro antes que tú, así que te toca leerlo y aburrirte como las ostras, te conozco y *you just want fried chicken*, pero es lo que hay. Eres una de las mejores personas que conozco, pero que mientras yo estaba terminando esto tú estuvieras en cierto evento no tiene perdón. *I'm sorry my dear, but you're up for elimination.*

Curro, otro futuro Doctor que sabe bien lo que es esto, te deseo lo mejor y que sigamos compartiendo nuestros momentos de desvarío y dramas varios del investigador, *choices*. Rubén, eres mi gallego favorito, hemos crecido a la vez que esta Tesis y sabes que estoy muy contento por todo lo que eres ahora, y por todo lo que será.

Víctor Tagua, gracias por acompañarme en esta última etapa, haberme descubierto HdC y acogido en el Desgranando, aunque de los desayunos sólo me queda recordarte que... *Dorado, no tostado.*

Álvaro, David, Víctor y Alberto, sabéis perfectamente que aquí pondría un gif de los míos y me quedaba tan a gusto, pero esto es una cosa seria y no creo que funcione, gracias por estar ahí en todo momento, incluida la montaña rusa destroza cervicales de cierto parque de atracciones...

Probablemente quede gente sin ser mencionada, y quiero darle las gracias a todo el que haya pasado por mi lado durante esta época de mi vida, siga presente en ella o no, al fin y al cabo, todos somos el resultado de lo vivido, porque con o sin bata de laboratorio todos somos personas.

Andrés J. Rascón



*« One day, one month, one year later.*

*Will we be living different lives? »*

*« Everything finds its place and leaves,*

*but I keep lingering in the same place »*







---

<b>Resumen</b> .....	<b>21</b>
<b>Summary</b> .....	<b>25</b>
<b>Objeto del Trabajo</b> .....	<b>29</b>
<b>I. Introducción y Antecedentes</b> .....	<b>1</b>
I.1 Presencia de contaminantes en muestras medioambientales y alimentos .....	3
I.1.1 Hidrocarburos policíclicos aromáticos en el Medio Ambiente y en los alimentos.....	6
I.1.1.1 Química de los hidrocarburos policíclicos aromáticos.....	6
I.1.1.2 Toxicidad de los hidrocarburos policíclicos aromáticos .....	8
I.1.1.3 Biomarcadores de exposición a hidrocarburos policíclicos aromáticos .....	11
I.1.1.4 Fuentes de hidrocarburos policíclicos aromáticos en el Medio Ambiente.....	12
I.1.1.5 Fuentes de hidrocarburos policíclicos aromáticos en los alimentos.....	13
I.1.2 Normativas sobre hidrocarburos policíclicos aromáticos en agua y alimentos .....	19
I.1.2.1 Marco Europeo sobre el Agua .....	19
I.1.2.2 Directiva Europea sobre las normas de calidad ambiental aplicables a las aguas superficiales .....	20
I.1.2.3 Real Decreto sobre el establecimiento de los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental .....	21
I.1.2.4 Reglamento Europeo sobre contenido máximo de hidrocarburos policíclicos aromáticos en productos alimenticios .....	22
I.2 Determinación de contaminantes en agua y alimentos .....	25
I.2.1 Técnicas para la preparación de muestra .....	27
I.2.1.1. Extracción líquido-líquido.....	28
I.2.1.2. Extracción asistida por microondas.....	30
I.2.1.3. Extracción asistida por ultrasonidos.....	32
I.2.1.4. Extracción Soxhlet .....	33
I.2.1.5. Extracción líquida presurizada .....	35
I.2.1.6. Extracción en fase sólida.....	36
I.2.1.7. Microextracción en fase sólida.....	42
I.2.1.8. Extracción por adsorción sobre barra agitadora .....	43
I.2.1.9. Método QuEChERS .....	47
I.2.1.10. Cromatografía de permeación en gel.....	47
I.2.2 Sistemas continuos de análisis para la preparación de muestra .....	49
I.3 Técnicas para la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos en aguas y alimentos 54	
I.3.1 Técnicas Cromatográficas.....	54
I.3.1.1 Cromatografía de gases .....	54
I.3.1.1.1 Columna cromatográfica .....	55
I.3.1.1.2 Control de la temperatura en el horno cromatográfico.....	56
I.3.1.1.3 Detectores .....	57

---

I.3.1.2	Cromatografía líquida de alta eficacia.....	63
I.3.1.2.1	Fase inversa .....	63
I.3.1.2.2	Intercambio iónico.....	63
I.3.1.2.3	Pares iónicos.....	64
I.3.1.2.4	Exclusión molecular .....	64
I.3.1.2.5	Detectores .....	65
I.3.2	Espectrometría de masas.....	71
I.3.2.1	Introducción de muestra .....	71
I.3.2.2	Fuente de ionización.....	72
I.3.2.3	Analizador de iones .....	72
I.3.2.4	Detectores .....	76
I.3.3	Acoplamiento de técnicas cromatográficas con la espectrometría de masas.....	77
I.3.3.1	Cromatografía de gases – espectrometría de masas .....	77
I.3.3.2	Cromatografía líquida de alta eficacia – espectrometría de masas.....	79
I.3.3.3	Espectrometría de masas en tándem.....	81
I.3.4	Electroforesis capilar .....	84
I.4	Referencias .....	87
<b>II.</b>	<b>Determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos en aguas medioambientales del sur de España mediante el uso de un sistema continuo de extracción en fase sólida y cromatografía de gases-espectrometría de masas .....</b>	<b>105</b>
<b>III.</b>	<b>Evaluación de los hidrocarburos policíclicos aromáticos presentes en productos alimenticios elaborados a base de cereales utilizando un sistema continuo de extracción en fase sólida y cromatografía de gases-espectrometría de masas .....</b>	<b>111</b>
<b>IV.</b>	<b>Utilización de un sistema continuo para la extracción en fase sólida y de la combinación de la cromatografía de gases y espectrometría de masas para la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos en bebidas alcohólicas y no alcohólicas.....</b>	<b>117</b>
<b>V.</b>	<b>Determinación multiresiduo de hidrocarburos policíclicos aromáticos en aceites comestibles mediante extracción líquido-líquido-extracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas.....</b>	<b>123</b>
<b>VI.</b>	<b>Determinación a nivel de traza de hidrocarburos policíclicos aromáticos en productos cárnicos y procedentes de la pesca mediante extracción asistida por ultrasonidos y extracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases-espectrometría de masas.....</b>	<b>129</b>
<b>VII.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>135</b>
<b>VIII.</b>	<b>Producción Científica de la Investigación.....</b>	<b>141</b>

---





# Resumen

---



## Resumen

En la presente Tesis Doctoral se ha planteado como objetivo principal la simplificación y automatización de las etapas previas de preparación de muestra de aguas ambientales y de alimentos para la determinación de los 16 hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) considerados como contaminantes prioritarios por la Unión Europea y la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo[ghi]perileno, dibenzo[a,h]antraceno, indeno[1,2,3-cd]pireno. Se ha puesto en marcha un sistema continuo semiautomatizado para la extracción en fase sólida, que consta de una columna empaquetada de 60 mg con un material sorbente como es el RP-18, con el fin de preconcentrar a los analitos y eliminar las interferencias provenientes de la matriz de la muestra. Gracias a las características del sistema continuo se ha aumentado notablemente la sensibilidad y selectividad de la metodología propuesta, ventajas que se han visto incrementadas con el uso de la técnica de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas. En el caso de muestras complejas como es la de los alimentos, que contienen una elevada concentración de proteínas y lípidos, se ha hecho necesaria una etapa de extracción asistida por ultrasonidos y otra de centrifugación con vistas a la eliminación de esas sustancias para que no perturbaran la adsorción de los PAHs en el sistema continuo. Los métodos propuestos presentan una sensibilidad que mejora notablemente a la de otras metodologías aparecidas en la bibliografía. Además, la precisión conseguida con las estrategias desarrolladas en esta Tesis Doctoral es satisfactoria con desviaciones estándar relativas inferiores al 7.5 %.

Los diferentes métodos desarrollados se han aplicado a un número elevado de muestras de aguas medioambientales (grifo, aguas urbanas, pozo, lago, río, piscina, mar y residuales) y alimentos (cereales y derivados, aceites, bebidas alcohólicas y no alcohólicas, carne y pescado). Habría que resaltar que muchas de las muestras analizadas contenían alguno de los analitos diana a concentraciones por debajo del límite máximo permitido. Además, se ha realizado un estudio de la eficacia de las estaciones depuradoras de agua residual para eliminar los PAHs presentes en este tipo de muestras, observándose que se reduce entre 6 y 8 la concentración. También se ha observado que las muestras de alimentos procesados incrementan notablemente la presencia de los contaminantes objeto de estudio en esta Memoria debido a la incompleta combustión de los compuestos orgánicos presentes en estas matrices o bien su contacto con humo contaminado.

---



# Summary

---



## Summary

The principal aim of this Doctoral Work is the simplification and automation of the previous steps for sample treatment for 16 different polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) considered as priority pollutants by the European Unions and the US Environmental Protection Agency: naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, crysene, benzo(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, dibenzo[a,h]anthracene, benzo[ghi]perylene and indeno[1,2,3-cd]pyrene. A continuous semiautomated solid-phase extraction system has been set up by using a 60 mg packed column of a RP-C18 material sorbent to eliminate the interferences from matrix sample and preconcentrate the analytes. Thanks to the system properties the sensibility and selectivity has been greatly increased, these advantages have been increased thanks to the use of gas chromatography technique coupled to mass spectrometry. In the case of complex samples matrices, which contains a high lipidic and protein concentration, steps of ultrasound assisted extraction and centrifugation were needed to eliminate those substances that interfered with the PAHs' sorption mechanism in the continuous system. The proposed methodologies provided high sensitivity in comparison with others presented in the literature. Also, the precision obtained with the developed strategies in this Thesis is satisfactory, with relative standard deviations under 7.5 %.

The different methodologies developed have been applied onto an elevated number of environmental water samples (tap water, urban, pond, well, river, swimming pool, sea and waste water) and foodstuff (cereals and derivates, edible oils, acoholic and non-alcoholic drinks, meat and fish). It should be noted that many of the samples analyzed contained at least one of the target analytes at concentrations under the maximum allowed limit. Also, a study over the efficiency of the waste water treatment plants for the PAHs removal, noticing that the PAHs concentration is reduced between 6 and 8 times. It also has been observed that the processed foodstuff samples increased the presence of the target contaminant studied in this Work due to the incomplete combustion of organic matter presented in these matrices or due to their contact with contaminated smoke.

---



# Objeto del Trabajo




---



## Objeto del Trabajo

El objetivo principal de la investigación llevada a cabo en esta Memoria radica en el desarrollo de nuevas metodologías para la determinación de los 16 hidrocarburos policíclicos aromáticos considerados como contaminantes prioritarios por la Unión Europea y la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos. Las matrices donde se van a aplicar las nuevas estrategias que se van a poner a punto serán aguas ambientales y alimentos. Para ello se ha profundizado en la etapa de preparación de muestra con objeto de su simplificación y automatización para reducir el consumo de reactivos y muestra, reducir el tiempo análisis y minimizar los errores en la aplicación de estas metodologías.

Los objetivos concretos que se han propuesto en la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

-  Puesta a punto de un sistema continuo para la extracción en fase sólida de hidrocarburos policíclicos aromáticos, basados en el uso de una columna empaquetada con un material sorbente adecuado con el fin de eliminar las interferencias de la matriz de la muestra y aumentar la sensibilidad a través de la preconcentración de los analitos.
  -  Simplificación y miniaturización de las etapas de pretratamiento de muestra, etapa previa a la introducción en el sistema continuo para la eliminación de interferentes presentes en la matriz de las muestras complejas (aguas medioambientales y alimentos) que pueden causar problemas en el desempeño del sistema continuo, mediante la adición de disolventes, extracción asistida por ultrasonidos y centrifugación. Para ello se optimizarán todas las variables involucradas en la purificación de extractos y la determinación de los contaminantes.
  -  Desarrollo y optimización del método analítico para la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos basado en la aplicación de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la cuantificación de estos contaminantes a niveles traza. Para ello se optimizarán las diferentes variables implicadas en la separación cromatográfica en la detección por espectrometría de masas.
-



Aplicación de las metodologías desarrolladas en la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos en muestras de aguas ambientales y alimentos (aguas, cereales y derivados, aceites, bebidas, carne y pescado). Además, se pretende estudiar el efecto que produce el procesado de los alimentos sobre la aparición de los contaminantes objeto de estudio en este tipo de matrices.

---

# **I. Introducción y Antecedentes**

---



## I.1 Presencia de contaminantes en muestras medioambientales y alimentos

En la actualidad y debido principalmente a la actividad humana, ya sea de manera directa o de manera indirecta, la presencia de sustancias químicas contaminantes es cada vez mayor en el Medio Ambiente (aire, agua y suelo) y, por consecuencia, en los seres que lo habitan, llegando finalmente a los seres humanos a través de la cadena trófica y amplificado por el efecto de la bioacumulación además de la exposición directa que también tienen a ella.

Estos contaminantes químicos presentes en el medio pueden haber llegado de manera directa al usarse por ejemplo sobre los cultivos y el ganado (por ejemplo, plaguicidas y fármacos) o de manera indirecta, como pueden ser los contaminantes procedentes de la quema de combustibles fósiles, producción industrial, etc.

A continuación, se describen algunos de los principales contaminantes químicos y derivados que pueden estar presentes en el Medio Ambiente y en los alimentos:

### Plaguicidas

Son sustancias utilizadas para controlar la población de una determinada población o para su eliminación. En este grupo se engloban los insecticidas organoclorados, herbicidas, fungicidas, insecticidas organofosforados y derivados como los bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas, furanos, etc.

Este tipo de sustancia están presentes en la agricultura y la industria desde el año 1877, cuando se empezó a aplicar el cianuro de hidrógeno gas como fumigante, además del uso de arsénico y compuestos como sales de cobre para el control de plagas. Los insecticidas orgánicos e inorgánicos se usaron hasta la aparición en los años 40 y 50 de los insecticidas organoclorados, los cuales presentaban una gran estabilidad frente a la descomposición y degradación en el medio, tenían una baja solubilidad en agua y eran altamente lipofílicos, familia a la cual pertenece el famoso para-diclorodifeniltricloroetano, el DDT (Baird, 2001).

La contaminación de los alimentos que proceden de una planta origen pueden serlo de manera directa, por aplicación de estos productos antes de su recogida y venta o de manera indirecta por absorción de los plaguicidas residuales presentes en el suelo, atmósfera o por el tratamiento de los silos de almacenaje con plaguicidas. La contaminación de animales ocurre por la ingestión de alimentos que contienen estos compuestos, por contacto con maderas tratadas y por el forraje (Belitz et al., 2004).

Los insecticidas más importantes son los organoclorados, organofosforados y los carbamatos. Los insecticidas organoclorados son persistentes en el Medio Ambiente y muy estables y solubles en lípidos, por lo cual se pueden acumular tanto en tejido graso como en leche humana. La contaminación por este tipo de insecticidas está descendiendo por su menor uso en favor de los ácidos de éster tiofosfóricos, carbamatos y piretoides. La ventaja de estos compuestos es su degradación en el medio en un corto plazo de tiempo. Los herbicidas son utilizados para proteger los cultivos de las malas hierbas y se dividen en herbicidas de amplio espectro o específicos. Los más específicos contienen reguladores de crecimiento como son los ácidos grasos ariloxi, ácido carbámico y derivados de urea, triazinas y piridinas, estos herbicidas se aplican sobre todo en campos de maíz sin prácticamente residuos peligrosos para los seres humanos, pero que afectan a los artrópodos y la microflora de los suelos.

Los fungicidas son los compuestos usados para proteger las plantas frente a hongos y levaduras, los más importantes son los ditiocarbamatos y los compuestos organometálicos. El hexaclorobenceno (HCB) es uno de los fungicidas más aplicados sobre vegetales.




#### Disruptores endocrinos

Estos compuestos son aquellos que son capaces de alterar el sistema hormonal de los animales con los que entra en contacto, afectando a los sistemas reproductivos y a su fertilidad, y a la posibilidad de generar células tumorales, desarrollando cáncer.

Estos disruptores interfieren en el sistema del organismo que se encarga de transmitir y sintetizar las hormonas. Estas hormonas se transfieren por todo el organismo a través del riego sanguíneo. Los estrógenos son los compuestos en los que la comunidad se está centrando al considerarse los de mayor riesgo para los seres vivos (Baird, 2001).


Multitud de compuestos químicos pueden enlazarse con el receptor destinado a las hormonas, bloqueando o alterando sus funciones, otros pueden romper las hormonas naturales existentes en el organismo. Estos disruptores interfieren en el correcto funcionamiento del sistema endocrino, algunos de los más importantes son el DDT, DDE, motoxiclor, toxalfeno, dieldrín, PCBs, dioxinas y compuestos que contienen oxígenos procedentes de residuos industriales.

El bisfenol-A es uno de los disruptores más estudiados actualmente por sus posibles efectos sobre el sistema endocrino, es un estrógeno no organoclorado y se polimeriza de manera industrial en la fabricación de plásticos de policarbonato y resinas epoxi. Este compuesto puede migrar de estos plásticos hacia alimentos al ser calentados, o por acción del alimento sobre el envase, ya que se encuentra también en el recubrimiento de los envases metálicos.

 Bifenilos policlorados

Los bifenilos policlorados (PCBs) son una mezcla de compuestos con diferente concentración de cloro. Su toxicidad varía en función del número de átomos de cloro que tenga disponibles y su patrón de sustitución en la molécula de bifenilo.

Estos compuestos son usados en la fabricación de plásticos, pinturas, en medios de intercambio de calor, en fluidos hidráulicos y en fluidos de transformadores, aunque su uso está en mínimos su gran estabilidad, persistencia y solubilidad en lípidos hace que todavía se encuentre presente en alimentos.

 Nitrosaminas, nitratos y nitritos

Las nitrosaminas y las nitrosamidas son unos carcinogénicos muy potentes, se generan a través de aminas secundarias, amidas *N*-sustituidas y ácido nitroso. Este tipo de compuestos se encuentra mayoritariamente en carnes que han sido tratadas para su conservación con nitratos y que por reacción con otros compuestos se generan nitritos y nitrosaminas, su presencia también es elevada en vegetales y en algunas ocasiones en agua potable (Sung, 2004). El uso de ácido ascórbico bloquea la reacción de formación de estos compuestos.

 Metales pesados

Los metales pesados que mayor riesgo medioambiental presentan son el mercurio (Hg), plomo (Pb), cadmio (Cd) y arsénico (As), debido a su uso extensivo, toxicidad y amplia distribución (Reilly, 2002).

El mercurio causante de intoxicaciones por ingesta de alimentos procede normalmente de compuestos organomercuriales, sales de metil mercurio y sales de fenil mercurio. Estos compuestos son altamente solubles en lípidos y acumulados en el sistema nervioso central, su presencia es alta en pescado por el efecto de la contaminación y por la creación de estas sales por parte de la microflora marina.

La contaminación por plomo se vio en aumento tras la revolución industrial y el uso de combustibles fósiles que contenían plomo en ellos. La absorción de plomo por parte de los organismos es relativamente baja, siendo la mayor parte excretada, hasta el añadido de un recubrimiento plástico a los envases de metal para la alimentación el plomo era el principal contaminante en alimentos envasados en latas de estaño, otra gran fuente de aporte de plomo era la utilización de tuberías para la conducción de agua de este metal (Baird, 2001).

---

Los iones de cadmio son rápidamente absorbidos por las plantas y se distribuye de manera uniforme por todos sus tejidos, en animales el cadmio es acumulado en órganos internos como son el hígado y páncreas. Los mayores aportes al medio de cadmio son por desechos industriales, fertilizantes y por las plantas de tratamiento de aguas (Fraga, 2005).

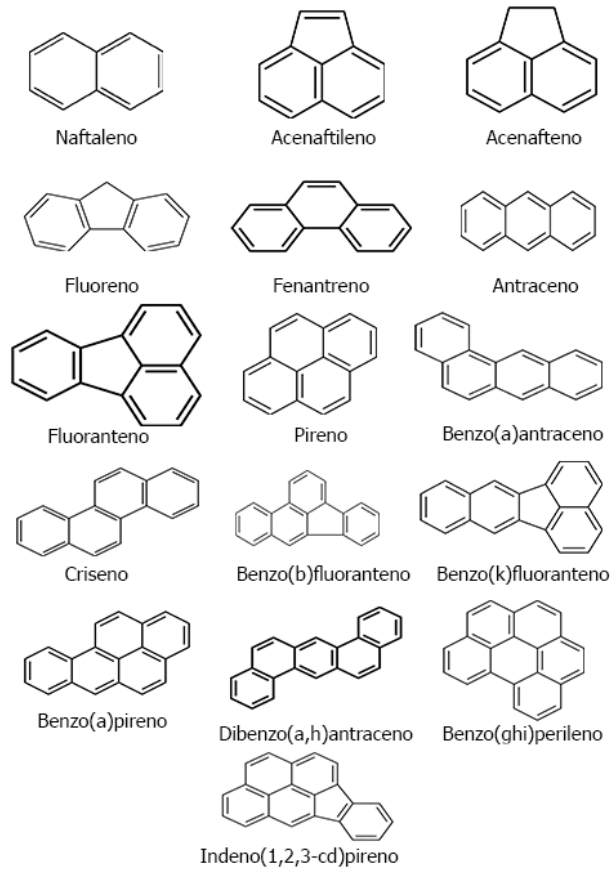
El arsénico es un semimetal que fue ampliamente vertido sobre el medio por su uso como plaguicida, y aunque su uso ya no está permitido los niveles en algunas zonas siguen siendo altas. En la producción de hierro y algunos otros metales el As es también generado, al igual que en la quema de carbón. El As es un demostrado carcinogénico, presente en alimentos por el uso de aguas contaminadas, normalmente aguas subterráneas, y anteriormente por su uso como plaguicida.

### I.1.1 Hidrocarburos policíclicos aromáticos en el Medio Ambiente y en los alimentos

#### I.1.1.1 Química de los hidrocarburos policíclicos aromáticos

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs, por sus siglas en inglés) son una familia de compuestos formados por dos o más anillos aromáticos, son semivolátiles, altamente solubles en lípidos y persistentes en el Medio Ambiente (Harvey et al., 1998). Aunque estos compuestos se generan de manera natural en erupciones volcánicas, incendios, y reacciones geotérmicas, la mayoría son causados por el efecto del ser humano; el uso de combustibles fósiles como son el carbón y petróleo, incendios, vertidos de plantas industriales, quema de basuras, etc. Además de la fuente por combustión, estos compuestos se pueden generar al someter a materia orgánica altas temperaturas, produciéndose el fenómeno de pirolisis y provocando la aparición de PAHs.

Estos compuestos nunca se presentan de manera aislada sino formando mezclas de ellos, lo cual dificulta su determinación. En esta Tesis serán objeto de estudio los 16 hidrocarburos policíclicos aromáticos (Figura I.1) que tanto la Comisión Europea como la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (EPA) catalogan como contaminantes prioritarios (Unión Europea, 2011; USEPA, 2012). En la Tabla I.1 se incluyen algunas de las principales propiedades fisicoquímicas de estas sustancias tóxicas.



**Figura I.1.** 16 Hidrocarburos policíclicos aromáticos considerados como contaminantes prioritarios por la EPA y la Unión Europea

El interés que provocan esta familia de compuestos es debido a sus propiedades carcinogénicas y teratogénicas. Estas propiedades han sido probada en numerosos estudios, y mientras algunos actúan como carcinogénicos en sí, otros actúan como sinergistas, potenciando la acción de los primeros.

Los seres humanos están expuestos a estas mezclas complejas de PAHs, los cuales se asocian principalmente a cáncer de piel, estómago, pecho y pulmón. Los estudios llevados a cabo sobre ratones y el efecto que éstos tienen sobre ellos no han podido ser extrapolados a humanos, de todas formas, se confía en ellos para estimar el riesgo de exposición sobre humanos. El riesgo en esta extrapolación reside en las diferencias entre la enzima que actúa en los PAHs en humanos y la que lo hace en ratones, ya que no se trata de un mecanismo similar. La mayor parte de los datos que se tienen en estudios en humanos proceden de inhalación y de absorción cutánea de los PAHs

en situaciones de exposición, tanto de manera aislada como junto a otros compuestos. Hay una relación entre el lugar de desarrollo del cáncer y la vía de administración de los compuestos. La administración oral, dérmica e intratraqueal dan lugar a tumores gástricos, de piel y de pulmón, según los estudios realizados por International Program on Chemical Safety (IPCS) (Anyakora et al., 2007).

**Tabla I.1.** Propiedades fisicoquímicas de los 16 hidrocarburos policíclicos aromáticos catalogados como contaminantes prioritarios en la Unión Europea y la EPA (Kästner et al., 2000).

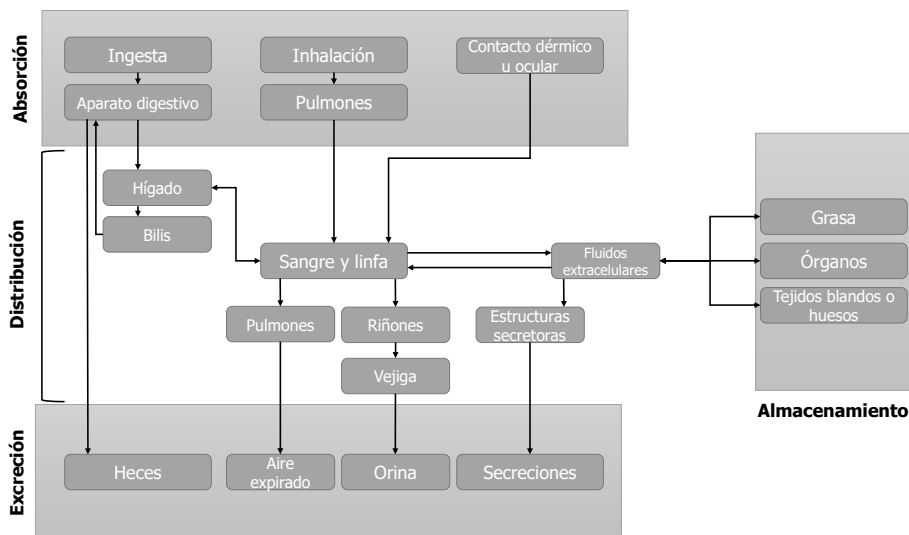
PAH	PM <sup>a</sup>	Punto fusión (°C)	Punto ebullición (°C)	Solubilidad en agua (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	Log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup>	Log K <sub>oc</sub> <sup>d</sup>
Naftaleno	128	80	218	30,00	3,37	3,1
Acenaftileno	152	92	265	16,10	4,07	-
Acenafteno	154	96	279	3,47	4,33	3,8
Fluoreno	166	116	298	1,80	4,18	3,9
Fenantreno	178	101	340	1,29	4,46	4,1
Antraceno	178	218	342	0,073	4,45	4,3
Fluoranteno	202	110	375	0,260	5,33	4,3
Pireno	202	150	404	0,135	5,32	4,8
Benzo(a)antraceno	228	159	435	0,014	5,61	4,8
Criseno	228	256	448	0,0006	5,86	4,9
Benzo(b)fluoranteno	252	168	-	0,0012	6,57	6,2
Benzo(k)fluoranteno	252	217	480	0,00055	6,84	5,6
Benzo(a)pireno	252	179	495	0,0038	6,04	5,3
Dibenzo[a,h]antraceno	278	267	524	0,0005	6,75	6,3
Benzo[g,h,i]perileno	276	278	-	0,00026	7,23	-
Indeno[1,2,3-cd]pireno	276	162	-	0,062	7,66	6,2

<sup>a</sup>PM: Peso molecular; <sup>b</sup>Solubilidad en agua a 20°C; <sup>c</sup>K<sub>ow</sub>: Coeficiente de partición octanol:agua; <sup>d</sup>K<sub>oc</sub>: Coeficiente de adsorción sobre carbón orgánico

#### I.1.1.2 Toxicidad de los hidrocarburos policíclicos aromáticos

Para que los hidrocarburos policíclicos aromáticos expresen su potencial como carcinogénicos y mutagénicos deben ser activados metabólicamente. Las personas y el resto de animales metabolizan estas moléculas con el único fin de eliminarlas del organismo, en ese momento es en el cual, paradójicamente, se muestran como sustancias cancerígenas, las bacterias presentes en el organismo también son capaces de metabolizar estos compuestos mediante enzimas dioxigenasa.

Los PAHs tienen principalmente tres rutas de absorción en humanos, a través de los conductos respiratorios por inhalación de partículas a las que han asociadas estos compuestos, por vía dérmica y a través del tracto gastrointestinal por ingesta de agua o comida contaminada. Estas rutas toxicocinéticas se encuentran representadas en la Figura I.2.



**Fig. I.2.** Ruta toxicocinética de los hidrocarburos policíclicos aromáticos

La absorción en el tracto gastrointestinal ocurre de manera rápida, lo cual viene determinado por la solubilidad acuosa y lipídica de estos compuestos, ya que la absorción requiere que los compuestos vayan desde las paredes intestinales y células hasta la circulación sanguínea y finalmente los tejidos que contienen una mayor proporción lipídica (Anyakora et al., 2007). Esta absorción incluye dos fases principales, la absorción en la mucosa, seguido de una difusión a través de las paredes del intestino, donde la presencia de aceites favorece la absorción de los PAHs, mientras que el agua y los sólidos la perjudican.

En pruebas realizadas con animales de laboratorio se ha observado que los PAHs se distribuyen por todo el organismo tras su administración, independientemente de la vía de entrada de estos, habiendo sido encontrado en casi todos los órganos del cuerpo, sobre todo en los más ricos en lípidos. Concentraciones máximas de benzo(a)pireno se han encontrado en tejidos porosos (hígado, sangre, cerebro) tras 1–2 horas desde la administración de una alta dosis de estos compuestos ( $76 - 152 \text{ mg Kg}^{-1}$ ). En tejidos menos porosos los niveles máximos tardan alrededor de 3 – 4 horas desde la administración (Anyakora et al., 2007).

La absorción por vía oral de dibenz[a,h]antraceno en ratas se distribuye hacia la mayoría de los tejidos del organismo. Tras la administración vía oral de benzo(a)pireno diariamente a ratas macho durante 7 días la actividad persistía en hígado, riñones, pulmones y testículos. En general, el nivel de PAHs encontrados en tejidos depende de varios factores: el tipo de PAH, la ruta de administración, el medio de transporte, el tiempo de tratamiento y el muestreo de tejidos seleccionados y la presencia de inductores o inhibidos es de metabolismo.

En los mamíferos, la metabolización en las células ocurre en los microsomas del retículo endoplasmático, esto se cataliza por el citocromo P-450 el cual está unido a enzimas mono-oxigenasa (Harvey et al., 1998). Estas nuevas moléculas oxidadas pueden transformarse de manera espontánea a fenol o seguir siendo metabolizadas, reaccionando por glutatión transferasa dando lugar a ácidos mercaptúricos. Los fenoles y hidrodioles pueden dar lugar a quinonas, diol epóxidos y otros compuestos oxigenados.

En esta fase de la metabolización nos encontramos con que la estructura de la molécula inicial ha dado lugar a unos compuestos con una polaridad diferente, en este caso aumentada, esto hace que el compuesto sea más electrófilo, incrementando su reactividad. Además, con la adición de grupos polares aumenta la solubilidad en agua de estos compuestos, la cual inicialmente era muy baja.

Aunque los diol epóxidos son difíciles de aislar normalmente por la facilidad que tienen de reacción con agua, proteínas, ácidos nucleicos y otros nucleófilos, están relacionados directamente con la carcinogénesis activa de los PAHs (Harvey et al., 1998).

Estas moléculas se enlazan con las cadenas de ADN del individuo de manera covalente y llevándose a cabo otras reacciones metabólicas que siguen cambiando estos diol epóxidos, lo cual provoca daños en la cadena de ADN y, por tanto, produciéndose mutaciones.

Los metabolitos de PAHs y sus conjugados son excretados predominantemente a través de las heces y en menor medida, en la orina. Los conjugados excretados en la bilis pueden ser hidrolizados por enzimas de la flora intestinal y pueden ser reabsorbidos. Estos compuestos se almacenan en el tejido graso, músculos y órganos, excepto aquellos que han sido activados y se han enlazado mediante enlace covalente a las cadenas de ADN.

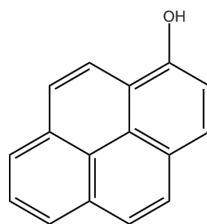
Debido a la gran cantidad de estructuras que presentan estos compuestos van a tener una gran variabilidad en la actividad biológicamente, la capacidad de unirse a las moléculas de ADN es directamente proporcional a su carcinogénesis, por tanto, la estructura química juega un papel importante en su enlace con los receptores de la cadena (Anyakora et al., 2007).

Los PAHs que adquieren estructura de fenantreno unido al menos a un anillo de benceno se han catalogado como los compuestos con mayor capacidad para unirse a cadenas de ADN, dividiéndose a su vez en compuestos que presentan una región bahía y una región fiordo. Estas dos regiones son atributos estructurales que tienen un efecto positivo a la hora de realizar en enlace de los PAHs sobre el ADN. La región fiordo del dibenzo(a,l)pireno causa atracción repulsiva entre dos enlaces opuestos en esta región, distorsionando la molécula y reestructurándola fuera del plano. Esto hace que la habilidad de los compuestos para modificar sus atributos estructurales a la hora de unirse a cadenas de ADN, generando una gran respuesta tumoral.

#### I.1.1.3 Biomarcadores de exposición a hidrocarburos policíclicos aromáticos

Hay varios biomarcadores usados para determinar la exposición interna a PAHs, estos incluyen metabolitos urinarios, puntos finales genotóxicos y aductor de benzo(a)pireno a ADN en linfocitos periféricos y otros tejidos orgánicos con proteínas como la albúmina.

El metabolito urinario utilizado principalmente es el 1-hidroxipireno, el fenantreno hidroxilado es también usado, pero en menor medida. El trasfondo de este método es que la concentración excretada de PAHs o metabolitos a través de fluidos corporales u orina no es solamente dependiente de la exposición, sino que depende también de la absorción, biotransformación y excreción, algo variable entre individuos (Simoneit et al., 1998).



**Fig. I.3.** 1-Hidroxipireno

El 1-hidroxipireno, representado en la Figura I.3, es usado como biomarcador urinario debido a su alta concentración en PAHs totales (entre 2 y 10 %) y su contenido en mezclas tiende a ser constante. Muchos estudios han relacionado la concentración de pireno con otros como son el benzo(a)pireno. Otra ventaja de usar el pireno como biomarcador es que este compuesto es metabolizado en 1-hidroxipireno, el cual se puede medir con relativa facilidad, siendo excretado en orina, mientras que otros PAHs se excretan a través de heces (Anyakora et al., 2007).

Los abductos de ADN con metabolitos activos de benzo(a)pireno son usados también como biomarcadores a la exposición a PAHs. Un alto peligro de cáncer ha sido encontrado en individuos fumadores, los cuales tienen una alta cantidad de estos aductos aromáticos en la cadena de ADN de las células blancas de la sangre.

#### I.1.1.4 Fuentes de hidrocarburos policíclicos aromáticos en el Medio Ambiente

La emisión de PAHs a la atmósfera está predominantemente afectada por los fenómenos de combustión, la quema de materia orgánica por actividades humanas sobrepasa las aportaciones que pueden realizarse por vías naturales al medio, en el caso de incendios forestales estos pueden tener un gran efecto sobre el Medio Ambiente durante semanas (Howsam et al, 1998). Las fuentes antropogénicas de este tipo de contaminantes incluyen diversas fuentes como son la cremación, calefacciones en viviendas, volatilización de compuestos en prospecciones petrolíferas y vertidos provocados por esta industria en aguas y suelos, los desechos de las áreas urbanas y los tratamientos de aguas residuales y quema de basuras.

Tras su formación, los PAHs entran a formar parte del Medio Ambiente ya sea por contaminación de agua, suelo o aire. Como se ha mencionado anteriormente, los hidrocarburos policíclicos aromáticos son compuestos con una alta liposolubilidad por su naturaleza apolar. Esto va a condicionar la manera en la que interactúa con el medio.

En suelos, la adsorción hidrofóbica es el mecanismo más importante por el cual los compuestos de PAHs se adsorben sobre las partículas que lo conforman, siendo una unión fuerte, y que algunos autores han considerado este mecanismo de adsorción como una penetración del compuesto en la propia matriz de la estructura del adsorbente, considerándolo una disolución en ellos (Conceição Fernandes et al., 2004). En el aire y agua se podría hablar de situaciones similares, los PAHs van a estar en suspensión en ambos fluidos por unión de estos a partículas que están en ese medio, en el caso del agua se presenta el hecho de tener poca solubilidad en este medio, haciendo de esta unión con otra materia orgánica esencial para su presencia en ella. En aire, si la molécula de PAHs contiene cuatro o menos anillos se mantiene en el aire como si de un gas se tratase, sin necesidad de estar unido a ninguna partícula en suspensión.

El caso de la escorrentía urbana, en cuanto a aguas residuales y partículas en el aire, las cuales precipitan al llover entrando en el ciclo del agua. Estos residuos urbanos están compuestos por una gran cantidad de PAHs procedentes de la quema de gasolinas en los transportes, la suciedad del suelo y la abrasión producida sobre los asfaltados. Toda esta contaminación acaba siendo vertida

sobre suelos y aguas subterráneas, en el caso de ciudades costeras también el mar se ve afectado. Finalmente, esta contaminación entrará en la cadena trófica por medio de deposición en las plantas, o por absorción a través de suelos y aguas y a los animales marinos y terrestres de la misma manera. Para los fumadores, el 87 % de los PAHs presentes en el aire de sus casas procede del tabaco (Howsam et al., 1998).

En zonas donde la contaminación ambiental está descontrolada como puede ser India o China, los niveles de PAHs encontrados en aguas son elevados (Fu et al., 2003). En Sudamérica los niveles de estos contaminantes en ríos como el Cauca sobrepasa los límites marcados hasta 35 veces en episodios de lluvias monzónicas, lo cual implica un mayor movimiento de sustancias en el medio (Sarria-Villa et al., 2016). En Europa, los niveles de contaminación por PAHs en zonas como los ríos de Sajonia y en el Mar del Norte los niveles no sobrepasan los límites establecidos (Siemers et al., 2015), mientras que, en Italia, los niveles encontrados en el río Samo, sobrepasan esta limitación establecida (Montuori et al., 2012). Las piscinas de baño son también aguas altamente contaminadas por PAHs debido a la contaminación ambiental y la presencia de estos compuestos en la piel de las personas provenientes de los aceites y protectores solares (EFSA, 2012).

#### I.1.1.5 Fuentes de hidrocarburos policíclicos aromáticos en los alimentos

La entrada de estos compuestos en la cadena alimentaria es relativamente sencilla debido a su gran presencia en el Medio Ambiente. Las plantas, animales y, finalmente, el ser humano se ven afectados por esta contaminación debido al efecto de la bioacumulación. Los alimentos pueden contaminarse por los PAHs que hay presentes en el Medio Ambiente. Estos contaminantes se pueden depositar sobre los cultivos si se encuentran en medio aéreo, acumulándose fácilmente en las ceras que recubren algunas frutas y plantas, además de entrar a través de ellos mediante su presencia en suelo y aguas (EFSA, 2012).

Los animales que se alimenten de estas plantas se verán afectados por la contaminación, incluidos los humanos, además de la contaminación que puede entrar por alimentación por piensos y demás. En el medio marino, los animales y plantas se ven afectados directamente por los vertidos de basuras, aceites, petróleo, etc.

La mayor fuente de PAHs para el ser humano se encuentra en la comida, el procesado de diferentes alimentos en procesos de secado, asado, ahumado y barbacoas aumentan los niveles de contaminación en los alimentos, esto es debido a que el alimento se pone en contacto directo con los productos de combustión. El almacenaje y recolección de alimentos también afecta a la presencia de PAHs en ellos por contacto con lubricantes y aceites de maquinaria, humos de esta y zonas de almacenaje que estén expuestas a contaminación por este tipo de compuestos (Duedahl-

Olesen et al., 2013). En la Tabla I.2 se muestra la exposición media y los márgenes de exposición (MOEs) a PAHs mediante alimentación en la UE.

**Tabla I.2.** Exposición media a PAHs y MOEs en la Unión Europea.

	Exposición dietética media		MOEs	
	Consumidores medios (ng Kg <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	Consumidores altos (ng Kg <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	Consumidores medios (ng Kg <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	Consumidores altos (ng Kg <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )
<b>Benzo(a)pireno</b>	3,9	6,5	17.900	10.800
<b>PAH2<sup>a</sup></b>	10,7	18	15.900	9.500
<b>PAH4<sup>b</sup></b>	19,5	34,5	17.900	9.900
<b>PAH8<sup>c</sup></b>	28,8	51,3	17.000	9.600

<sup>a</sup>PAH2: benzo(a)pireno, criseno; <sup>b</sup>PAH4: benzo(a)pireno, criseno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno; <sup>c</sup>PAH8: benzo(a)pireno, criseno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, dibenzo(a,h)antraceno, indeno(1,2,3-cd)pireno. Fuente: AECOSAN (2017).

 Cereales

Como se ha mencionado anteriormente, los PAHs pueden llegar a los alimentos elaborados de cereales por deposición atmosférica, a través de aguas y por presencia en suelos. Pero el procesamiento de estos alimentos hace que los niveles de contaminación aumenten. Los cereales normalmente sufren un proceso de secado en el cual se elimina la mayor parte del agua que puedan tener para protegerlos frente a microorganismos, aumentar su conservación y además mejorar sus características organolépticas, el uso de aromas artificiales también influye en la presencia de este tipo de compuestos.

Durante el almacenaje en silos de este tipo de productos se puede producir contaminación de esta materia prima por deposición a través de las zonas de ventilación y la suciedad y polvo existentes en el silo previos a su almacenaje, debido a que los PAHs pueden estar fuertemente unidos a las partículas de polvo (Aldrick, 2012). Antes de su uso o paso a otra etapa de procesamiento, normalmente la molienda, los granos deben ser limpiados de semillas no deseadas, partículas de suelo, polvo, etc. Este paso se hace por gravedad específica y en ningún momento el grano es lavado con agua para evitar la formación de microorganismos, por lo que los PAHs adheridos a la superficie del grano difícilmente son eliminados en este paso (Belitz et al., 2004).

Alimentos como el arroz, trigo, cebada, maíz, etc. van a ser una gran fuente de PAHs para el ser humano, no tanto por una alta concentración en ellos, pero sí por el alto consumo de este tipo

de productos en la dieta, según datos de la FAO se consumen 147 kilos de cereales por persona y año (FAO, 2017).

La existencia de PAHs en este tipo de alimentos no sólo va a depender del tipo de proceso al que se le ha sometido, sino también a la temperatura, el tiempo y la fuente de energía que se utilice para llevar a cabo el procesado y cocinado de los alimentos, así como la presencia de humos y sustancias volátiles procedentes de otros ingredientes como el aceite (Rey-Salgueiro et al., 2008). Algunos productos como son el pan de centeno necesitan un precocinado a 400°C durante 1 a 3 minutos previos a un cocinado en torno a 150 °C, la alta temperatura alcanzada en la primera etapa de fabricación previsiblemente será una gran fuente de formación de PAHs (Belitz et al., 2004). El uso de fuentes de calor indirectas para el cocinado de alimentos también influye en la presencia de estos contaminantes, un claro ejemplo de este tipo de procesado sería el uso de un tostador por resistencias, en el cual el alimento no entra en contacto directo con la fuente, todo lo contrario al uso de tostadores que usan gas como combustible en los que el alimento se ve expuesto tanto al proceso térmico como a los gases derivados de la combustión, la contaminación en el alimento en cuestión sería la suma de la generación de estos a partir de nutrientes por pirólisis y la deposición de los gases de combustión.

La gran variedad de productos derivados de cereales que encontramos en el mercado incluye galletas, harinas, pasta, cereales de desayuno, arroces y panes, con una gran variedad de métodos de cocinado como son el horneado, tostado, fritura, cocción, secado, etc. tanto a nivel industrial como en casa, todo esto influye finalmente en la concentración de PAHs existentes en los alimentos y que el consumidor va a ingerir.

### ~ Bebidas

La presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos en bebidas depende principalmente de la naturaleza de éstas. En este caso podemos tener bebidas alcohólicas destiladas y fermentadas, bebidas que proceden de grano y plantas que has sido secados y tostados como son el café, té y cerveza, otros provienen de frutas como los zumos y vinos, y otras están basadas en el azúcar y su transformado en caramelo como son los refrescos. Todas estas bebidas pasan por múltiples y diferentes etapas de fabricación, las cuales harán que la presencia de este tipo de contaminantes varíe entre las diferentes bebidas.

Los zumos son normalmente obtenidos directamente de la fruta por medio de tratamiento mecánico, la proporción de sólidos en el producto final puede ir desde el 5 hasta el 20 %, dependiendo de la naturaleza del zumo se le añade una mayor o menor cantidad de azúcar, lo cual afectará a los niveles finales de PAHs en el producto final (Belitz et al., 2004). El lavado de la fruta y el pelado van a ser determinantes a la hora de que estos compuestos alcancen el producto final,

los PAHs en frutas suelen estar sobre la piel y adherida a las ceras que la recubren, por tanto, si no es pelada o lavada correctamente los niveles de PAHs aumentarán (Silva et al., 2011).

En el caso del vino, al igual que en algunos destilados, se produce un envejecimiento del producto en barrica o con chips de madera, donde es fermentado. Estas barricas han sido previamente tratadas para darles unas propiedades aromáticas especiales, normalmente estas barricas son de roble, la madera es expuesta al exterior y a sus condiciones climatológicas durante un lapso de tiempo que va desde 1 a 3 años, por tanto, la polución presente en el medio va a depositarse sobre la madera, después de esto la madera sufre un proceso de tostado, por el cual se expone directamente a fuego de madera de roble y el humo que se genera, lo cual hace que estos contaminantes impregnen la madera y finalmente vayan a ser transferidos al producto final. Los chips de madera que se pueden usar también en el envejecimiento de estas bebidas pueden ser tostadas por hornos eléctricos, de convección o de infrarrojos, variando los niveles de contaminación dependiendo de la fuente usada para este fin (Chinnici et al., 2007). En el vino habría que además tener en consideración lo expuesto anteriormente para las frutas.

Las bebidas destiladas presentan como ingrediente principal el azúcar, el cual va a ser una fuente de PAHs para el producto final, en muchos casos este azúcar además de haber sufrido la contaminación ambiental es secado para obtener el producto final, otras veces es caramelizado y añadido a algunas bebidas, como es el caso del ron (Belitz et al., 2004), o en el caso de la bebida brasileña cachaça, la plantación de azúcar es directamente quemada previa a su recolección (Galinaro et al., 2009).

En bebidas como el café y el té la mayor fuente de contaminación por PAHs se produce en los procesos de secado y torrefactado tanto de las hojas de té como de los granos de café. En refrescos el uso de azúcares en alta proporción va a ser la principal fuente de contaminantes para este producto, además este azúcar tiende a ser caramelizado, el uso de aromas para estas bebidas también es un factor para tener en cuenta. El uso de aceites comestibles para mejorar la estabilidad y la turbidez de los refrescos también va a aportar una porción de PAHs, ya que estos son altamente solubles en lípidos (Shachman et al., 2004).

Las cervezas son productos provenientes de la fermentación de cereales, los cuales han sufrido un proceso de secado y tostado que va a proporcionar una serie de características organolépticas al producto final, en esta etapa se generan una serie de compuestos no deseados, entre los que se encuentran los hidrocarburos policíclicos aromáticos, además, el uso de otros cereales que no son la cebada, como son el maíz, arroz, etc., aportan a esta contaminación, al igual que ocurre con los azúcares añadidos para mejorar la fermentación del producto (Belitz et al., 2004).

---

### ∩ Aceites vegetales

La presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos en aceites comestibles dependerá de la naturaleza de este, si proviene de un fruto o de semillas y si ha sufrido un tratamiento posterior a su extracción para su refinado.

En el caso de aceites que provienen de frutos, como es el caso del aceite de oliva, la presencia de PAHs va a venir determinada por la contaminación ambiental a la que son expuestos, estos compuestos se quedarán adheridos a la superficie del fruto, durante la recolección se pueden ver afectados por los gases de combustión y los aceites de lubricación de la maquinaria usada para ello.

Para la elaboración de los aceites de oliva virgen extra no se permite ningún tratamiento que no sea la extracción mecánica, por tanto, el lavado del fruto previo a la extracción es un paso determinante para la existencia de PAHs en los aceites, si el agua no está limpia o no se lava de manera correcta la presencia de estos compuestos tanto en la superficie como en polvo o tierra que lo acompañan afectarán a los niveles de PAHs. En el caso de aceites refinados, estos se pasan por lechos de tierras diatómeas o carbón activo, lo cual reduce la presencia de estos compuestos de manera notable (Teixeira et al., 2007).

En el caso de aceites que provienen de semillas, como son los de girasol, sésamo, etc., que han sido sometidas a procesos de secado para eliminar la mayor cantidad posible de agua y aumentar el rendimiento de la extracción, estas semillas se ponen en contacto con calor y con gases de combustión, lo cual puede llevar a contaminación por PAHs (Mafra et al., 2010), igualmente, el refinado de estos aceites ayuda a reducir la presencia de PAHs en ellos.

### ∩ Carne y pescado

La presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos en carnes y pescados está influenciada por la bioacumulación, así como por la contaminación del medio, alimentación por piensos y finalmente por el procesado y cocinado de estos alimentos.

El efecto de la bioacumulación afecta a los animales y peces de manera directa al estar en una escala superior en la cadena trófica, estos animales se ven afectados por la contaminación del medio ya existente y que afecta a todos los seres de una manera similar, pero a su vez estos animales se van a alimentar de plantas en el caso de animales y pequeños peces y plancton en el caso de peces, los cuales en su organismo ya han sido contaminados por PAHs, lo cual va amplificando la presencia de PAHs (Jahurul et al., 2013). Además, los animales suelen ser alimentados en granjas usando piensos elaborados de cereales y demás productos que han sufrido

---

procesos térmicos como los citados anteriormente para los alimentos basados en cereales. En el mar, los peces sufren la contaminación añadida de vertidos de petróleo y derivados, basuras, etc.

El procesado y cocinado de estas materias primas para la fabricación de alimentos, ya sea en plantas industriales o en casa afecta de manera importante a los niveles de PAHs en ellos. El parrillado, asado, barbacoas, ahumado, secado y la fritura son algunas de las formas más utilizadas para la transformación de los alimentos. El secado de alimentos se utiliza principalmente para la conservación de alimentos eliminando la mayor parte del agua que contienen, normalmente va acompañado del ahumado. En el ahumado que nos proporciona unas propiedades bactericidas y antioxidantes sobre el producto, la presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos depende principalmente de cómo se genere el humo y de qué manera se va a aplicar. Podemos tener una aplicación directa, donde la materia que está siendo quemada para producir este humo y el producto están directamente en contacto y se puede realizar de manera indirecta, en la cual el humo es llevado al alimento a través de conducciones. El uso de filtros ayuda a reducir la carga de PAHs existente en el humo utilizado (Belitz et al., 2004).

El uso de llamas o calor directo a la hora de realizar un parrillado o barbacoa afecta al nivel de PAHs presentes en los alimentos, normalmente se usa carbón en este tipo de procesos, sobre todo en las barbacoas en casa. La grasa, al caer sobre las brasas, genera una gran cantidad de estos contaminantes, los cuales se adhieren sobre la superficie de la carne y el pescado (Farhadian, 2010). En el Codex Alimentarius se recogen una serie de recomendaciones para que las condiciones de cocinado tengan en consideración la exposición a PAHs. El uso de envolturas de un film de aluminio o de hojas de banana pueden ser útiles para evitar la deposición de estos contaminantes sobre los alimentos, siendo fácilmente aplicables tanto en industria, como en restaurantes y hogares (FAO, 2009).

## I.1.2 Normativas sobre hidrocarburos policíclicos aromáticos en agua y alimentos

Actualmente existen dos legislaciones, la primera es el Marco Europeo sobre el Agua (European Water Framework) y la segunda es el Reglamento (UE) N° 835/2011, el cual modifica al Reglamento N° 1881/2006 en lo que respecta al contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en productos alimenticios. Estos Reglamentos Europeos son de aplicación directa en todos los estados miembros de la Unión Europea sin necesidad de que cada país tenga que emitir su propia legislación, en el caso de España a través del Real Decreto correspondiente.

En Estados Unidos, bajo el *Safety Drinking Water Act* la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) ha limitado la presencia de benzo(a)pireno en agua potable a  $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$  (EPA, 2016). Actualmente no hay regulación alguna sobre el resto de compuestos en agua ni en alimentos, a pesar de que tanto EPA como la Agencia Para la Sustancias Químicas y Registro de Enfermedades (ATSDR) los tienen incluido en la lista de contaminantes peligrosos (ATSDR, 2017).

En Canadá, la Agencia de Inspección de Alimentos (CFIA) ha establecido un límite máximo de  $3 \mu\text{g K}^{-1}$  de benzo(a)pireno en aceites de oliva de orujo, mientras que en agua el límite de presencia de este compuesto es de  $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$  (CFIA, 2018). En China, la regulación está algo más avanzada y mediante la Normativa GB2762-2012 se regula la presencia de benzo(a)pireno en harinas y ahumados de carne y pescado en  $5 \mu\text{g Kg}^{-1}$  mientras que en aceites el valor sube a los  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  (China National Standard, 2012).

### I.1.2.1 Marco Europeo sobre el Agua

Las bases del Marco Europeo sobre el Agua comenzaron en los años setenta, cuando por primera vez se comenzaron a establecer estándares y objetivos de límites sobre sustancias peligrosas en agua de bebida, aguas de zonas pesqueras, de baño y aguas subterráneas, con el fin de proteger al ser humano y el Medio Ambiente. No fue hasta 1988 cuando se establecieron los primeros límites y objetivos a cumplir por los estados miembro, obligándolos a controlar las zonas urbanas, el uso de fertilizantes nitrogenados en agricultura y la polución provocada por la industria.

En 1991 se establece la Directiva sobre presencia de nitratos en aguas y la Directiva sobre aguas de deshecho. En 1996 se estableció la Directiva para la prevención y control de la polución (IPPC) y en 1998 se establece una Directiva que regula el agua usada para bebidas.

Finalmente, en el año 2000 la Comisión Europea publicó la Directiva marco sobre aguas, siendo la más completa lanzada hasta la fecha, englobando la polución en aguas superficiales, aguas subterráneas y el establecimiento de un estatus ecológico. Para llevar a cabo esto, la Comisión llevó

a cabo un proceso de consulta entre los Estados miembro, Parlamento europeo, expertos, autoridades locales, técnicos ambientales e industrias (Unión Europea, 2010).

Esta Directiva se apoya en cuatro puntos básicos:

- ~ Coordinación de acciones para conseguir el estatus de buena calidad en aguas de la Unión Europea incluyendo las aguas superficiales y subterráneas en el año 2015.
- ~ Establecimiento de un sistema de gestión de aguas basadas en los cauces naturales de los ríos y de las regiones que cruzan.
- ~ Control integral de aguas, resultando en diferentes tipos de gestión a problemas de aguas dentro de un solo marco de referencia.
- ~ Participación activa de los Estados miembro y de la población.

Todo esto aplicado sobre aguas subterráneas y superficiales, incluyendo ríos, lagos, aguas de costa y transición como de estuarios que conectan aguas dulces y saladas.

#### I.1.2.2 Directiva Europea sobre las normas de calidad ambiental aplicables a las aguas superficiales

Esta Directiva define a la contaminación de las aguas superficiales como amenaza real para el medio acuático, con efectos de toxicidad tanto aguda como crónica para los organismos acuáticos y su acumulación en los ecosistemas, provocando pérdidas de biodiversidad, lo cual también afecta a los seres humanos (Unión Europea, 2008). En base a lo expuesto en esta Directiva los Estados miembros deben aplicar las medidas necesarias con objeto de reducir progresivamente las emisiones de sustancias peligrosas prioritarias, este control se debe dar en conformidad de la Directiva 2000/60/CE, así como proveer de datos y conocimientos disponibles sobre el origen y presencia de estas sustancias y de las vías de contaminación con el fin de definir modalidades de control específicas y eficaces.

Entre todas las sustancias prioritarias que se han listado en esta Directiva se encuentran 8 hidrocarburos policíclicos aromáticos, según el espíritu de la legislación estas sustancias deben dejar de ser emitidas a la atmósfera de forma gradual. Estos contaminantes son producidas en parte de manera natural, por tanto, esa fuente no va a poder ser eliminada, el resto de focos de emisión deben dejar de serlo, algo que es prácticamente imposible.

Esta Directiva dispone que todas estas sustancias incluidas están en continua revisión, en la Tabla I.3 se encuentran los hidrocarburos policíclicos aromáticos prioritarios en diferentes aguas.

**Tabla I.3.** PAHs prioritarios en agua según la Directiva 2008/105/CE.

Sustancia prioritaria	Número CAS	NCA-MA <sup>b</sup> Aguas superficiales continentales <sup>a</sup>	NCA-MA Otras aguas superficiales <sup>a</sup>	NCA-MA Aguas superficiales continentales <sup>a</sup>	NCA-CMA <sup>c</sup> Otras aguas superficiales <sup>a</sup>
<b>Antraceno</b>	120-12-7	0,10	0,10	0,40	0,40
<b>Fluoranteno</b>	206-44-0	0,10	0,10	1,00	1,00
<b>Naftaleno</b>	91-20-3	2,40	1,20	No aplicable	No aplicable
<b>Benzo(a)pireno</b>	50-32-8	0,05	0,05	0,10	0,10
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>	205-99-2	Σ=0,03	Σ=0,03	No aplicable	No aplicable
<b>Benzo(k)fluoranteno</b>	207-08-9				
<b>Benzo[g,h,i]perileno</b>	192-24-2	Σ=0,002	Σ=0,002	No aplicable	No aplicable
<b>Indeno[1,2,3-cd]pireno</b>	193-39-5				

<sup>a</sup> µg L<sup>-1</sup>; <sup>b</sup>NCA-MA: Normas de Calidad Ambiental, Media Anual; <sup>c</sup>NCA-CMA: Normas de Calidad Ambiental, Concentración Máxima Admisible.

El establecimiento de Normas de Calidad Ambiental (NCA) para estos contaminantes deben establecerse de manera obligatoria y siempre basándose en los datos acumulados de contaminación a medio y largo plazo.

#### I.1.2.3 Real Decreto sobre el establecimiento de los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental

Este Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental viene a transferir la Directiva Europea 2008/15/CE a la Ley Española (BOE, 2015).

En él se articulan los programas de seguimiento de las masas de aguas superficiales en España y la declaración del estado de las mismas. La evaluación de aguas dicta que el estado general de la masa de agua quedará determinado por el peor valor obtenido en la evaluación ecológica y química, las cuales se harán en función a las Normas de Calidad Ambiental (NCA) establecidas en cada caso. Siendo los niveles de sustancias prioritarias contaminantes las indicadas anteriormente en la Tabla I.1.

#### I.1.2.4 Reglamento Europeo sobre contenido máximo de hidrocarburos policíclicos aromáticos en productos alimenticios

La presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos en productos alimenticios está regulada por los Reglamentos (CE) N° 1881/2006 (Unión Europea, 2006) y su modificación por el Reglamento (CE) N° 835/2011 (Unión Europea, 2011) por lo que respecta al contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los productos alimenticios y el Reglamento (UE) 2015/1933 (Unión Europea, 2015) que modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en la fibra de cacao, las chips de plátano, los complementos alimenticios, las hierbas secas y las especias secas.

Inicialmente, el Reglamento 1881/2006 se puso en marcha debido a las diferencias en la legislación existente en cada país miembro y era necesario mantener una unidad de mercado. En cuanto a los contaminantes que se consideran cancerígenos genotóxicos, como es el caso de los hidrocarburos policíclicos aromáticos, o que la población haya sido expuesta a altos niveles se establecen contenidos máximos tan bajos como sea razonablemente posible, haciendo énfasis en la protección de la salud de los lactantes y niños, estableciendo unos niveles máximos más bajos.

En esta reglamentación se indica que si un alimento supera los contenidos máximos de un contaminante no debe ser comercializado como tal, ni tras mezclarse con otros alimentos o usarse como ingrediente para la fabricación de algún otro. En esta normativa se ve necesario el realizar unos ensayos más pormenorizados en cuanto a la presencia de PAHs en alimentos, teniendo el benzo(a)pireno como marcador, fijando unos contenidos máximos en grupos de alimentos que están muy expuestos a contaminación ambiental y procesado industrial.

La Comisión, junto a la ayuda proporcionada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) establecieron que, tras la evidencia científica, que el benzo(a)pireno no es un marcador adecuado para marcar la presencia de PAHs en alimentos, por lo que se creó un sistema de 4 sustancias (PAH4) (benzo(a)pireno, criseno, benzo(a)antraceno y benzo(b)fluoranteno) o de 8 (PAH8), aunque la EFSA indica que el sistema de 8 sustancias no aporta valor añadido al de 4 sustancias (EFSA, 2012), por tanto, el Reglamento se ciñe a estas 4 sustancias, los niveles fijados por el Reglamento en diferentes grupos de alimentos se muestran en la Tabla I.4.

La aplicación de esta norma en España se realiza de manera directa haciendo uso del Reglamento de la Comisión Europea sin necesidad de haber aplicado un Real Decreto.

**Tabla I.4.** Contenido máximo permitido de hidrocarburos policíclicos aromáticos en productos alimenticios por el Reglamento (CE) N° 835/2011 y Reglamento (UE) N° 2015/1933.

Producto alimenticio	Contenido máximo ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )	
	Benzo(a)pireno	Suma de benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno y criseno
Aceites y grasas (excluida la manteca de cacao y aceite de coco) destinados al consumo humano directo o a ser usados como ingrediente en productos alimenticios	2,0	10,0
Granos de cacao y productos derivados	5,0	30,0
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	2,0	12,0
Carne de pescado ahumado y productos pesqueros. El contenido máximo para los crustáceos ahumados se aplica a la carne de los apéndices y el abdomen. En el caso de los cangrejos ahumados y crustáceos similares ahumados ( <i>Brachyura</i> y <i>Anomura</i> ), se aplica a la carne de los apéndices	2,0	12,0
Espadines ahumados y espadines ahumados en conserva ( <i>sprattus sprattus</i> ); moluscos bivalvos (frescos, refrigerados o congelados); carnes y productos cárnicos tratados térmicamente y vendidos al consumidor final	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
Preparados para lactantes y preparados de continuación, incluida la leche para lactantes y la leche de continuación	1,0	1,0
Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos a lactantes	1,0	1,0

**Tabla I.4. (Continuación)** Contenido máximo permitido de hidrocarburos policíclicos aromáticos en productos alimenticios por el Reglamento (CE) N° 835/2011 y Reglamento (UE) N° 2015/1933.

Producto alimenticio	Contenido máximo ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )	
	Benzo(a)pireno	Suma de benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno y criseno
Fibra de cacao y productos derivados de la fibra de cacao destinados a ser utilizados como ingredientes en alimentos	3,0	15,0
Chips de plátano	2,0	20,0
Complementos alimenticios que contengan sustancias botánicas y sus preparados Complementos alimenticios que contengan propóleo, jalea real o espirulina y sus preparados	10,0	50,0
Hierbas secas	10,0	50,0
Espicias secas, excepto el cardamomo y el Capsicum spp. Ahumado	10,0	50,0

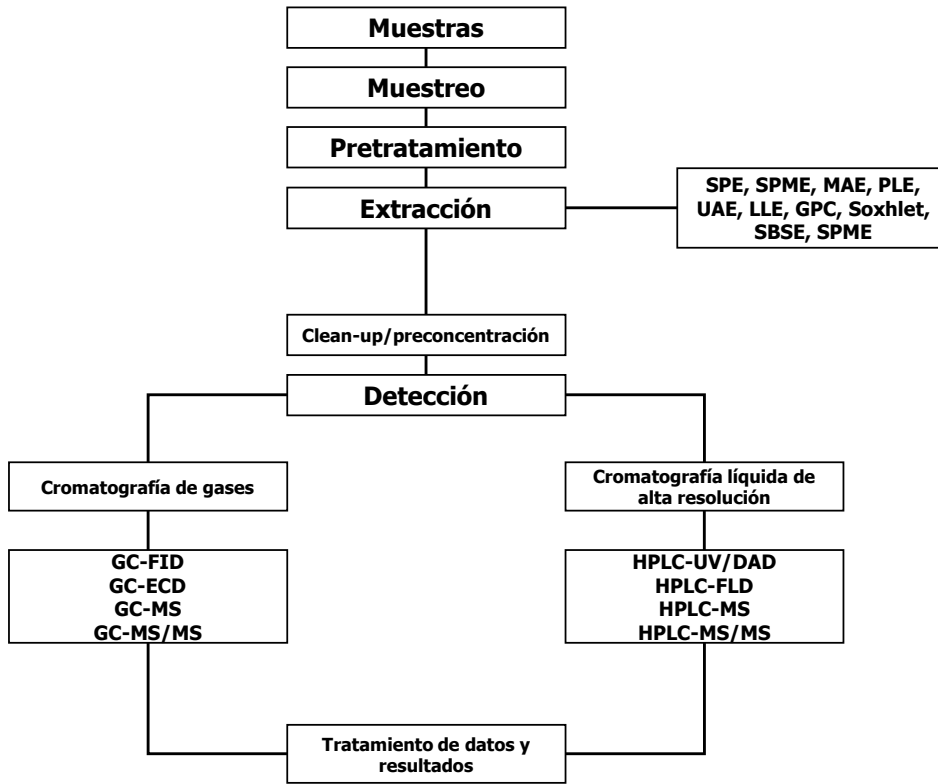
## I.2 Determinación de contaminantes en agua y alimentos

Para la determinación de sustancias en muestras de aguas y alimentos requiere la combinación de diversas etapas debido a su gran complejidad. En la Figura I.4 se esquematizan las etapas necesarias para la extracción y determinación de compuestos en este tipo de matrices.

El tratamiento de la muestra tiene como fin principal el de aislar los analitos de la mejor manera posible, eliminando en la medida de lo posible la matriz en la que están contenidos, siendo la primera etapa la encargada de realizar esta separación entre analitos y matriz. Esta etapa va a ser crítica a la hora de obtener un resultado final óptimo, si el procedimiento de extracción no se ha realizado de la mejor manera posible parte de estos analitos seguirán en la matriz de la muestra, resultando en un error en su determinación (Poster et al., 1998).

Para determinar si el método de extracción de los analitos de la matriz que los contiene es efectivo o no, se puede realizar una serie de extracciones sucesivas en las que se realizan varias extracciones siguiendo el procedimiento sobre la misma muestra y posteriormente se comprueba la existencia o no de los analitos en estos extractos, dándonos a conocer el número de extracciones que es necesario realizar para obtener la totalidad de los analitos. En el caso de que el procedimiento no sea el adecuado, no se podría extraer por completo todos los compuestos. Otra forma de estudiar la efectividad del método de extracción es el uso de muestras enriquecidas, las cuales han sido fortificadas con una concentración determinada por el analista. Mediante la comparación entre la concentración determinada y añadida se puede conocer el buen funcionamiento de la metodología. Hay que tener en cuenta que la extracción de los analitos nunca será completa al sufrir estos una serie de interacciones con la matriz de la muestra, así como las pérdidas habituales durante la manipulación de la muestra y el método extractivo.

El principal fin de la etapa de extracción es la de separar de la muestra los compuestos o partes que son de interés y proveen una determinada información (Cela et al., 2003). Estas técnicas de separación se sitúan en una etapa intermedia del proceso analítico, su complejidad puede variar dependiendo de la naturaleza de las muestras y de los analitos objeto de estudio, si estos están en una muestra sólida o líquida, de la presencia o no de compuestos coextraídos y de la técnica de determinación que se haya seleccionado, lo cual hará necesario que nuestro extracto se encuentre en una determinada forma previo al análisis.



**Fig. I.4.** Esquema de las etapas necesarias para la determinación de compuestos en muestras de agua y alimentos. DAD: detector de díodos en fila; ECD: detector de captura de electrones; FID: detector de ionización de llama; FLD: detector de fluorescencia; GC: cromatografía de gases; GPS: cromatografía de permeación de geles HPLC: cromatografía de líquidos de alta resolución; LLE: extracción líquido-líquido; MAE: extracción asistida por microondas; MS: espectrometría de masas; MS/MS: tándem de espectrometría de masas; PLE: extracción acelerada con disolventes; SBSE: extracción por sorción sobre barra agitadora; SFE: extracción con fluidos supercríticos; SPE: extracción en fase sólida; SPME: microextracción en fase sólida; UAE: extracción asistida por ultrasonidos; UV: detector ultravioleta

Estos analitos ya extraídos de la matriz de la muestra normalmente se suelen encontrar a niveles traza en muestras ambientales y en alimentos, por lo que es necesario realizar una etapa de preconcentración de estos extractos previo a la determinación cromatográfica. En muchas ocasiones y en análisis a nivel traza, es usual recurrir a estas técnicas no ya por problemas de interferencias sino para poder alcanzar los niveles de concentraciones de los analitos necesarias para poder ser determinados (Cela et al., 2003). En algunas ocasiones la esta etapa se lleva a cabo mediante la eliminación de disolventes orgánicos, habría que tener cierta cautela y cuidado al realizar esta eliminación, ya que en muchas ocasiones los compuestos a analizar son también volátiles, sobre

todo en el caso de realizar una determinación mediante cromatografía de gases y los analitos pueden verse afectados mediante su volatilización y pérdida de los mismos.

En este apartado se realiza una revisión bibliográfica de las técnicas para la preparación de muestras ambientales y alimentos y las técnicas para la determinación de PAHs en estos tipos de matrices.

### I.2.1 Técnicas para la preparación de muestra

La primera etapa a la que se enfrenta un analista cuando quiere llevar a cabo el análisis de aguas o alimentos consiste en la toma de muestra, cuyos procedimientos se encuentran recogidos en diferentes guías o normas de carácter internacional, tales como las editadas por organizaciones como la Organización Internacional para la Estandarización (ISO) o la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM), que editan normativas recomendando protocolos para asegurar la calidad de todo el proceso analítico, incluyendo la etapa de toma de muestra. El estado físico de la muestra condicionará en muchos casos la forma de tomar la muestra. La homogeneidad que suele acompañar a las muestras de líquidos y gases permite planificar una toma de muestra para la recogida de pequeñas cantidades o volúmenes, con un riesgo menor de falta de representatividad. En cambio, en el caso de muestra sólidas, su inherente mayor heterogeneidad aconseja llevar a cabo un pretratamiento previo con el fin de disminuir los problemas derivados de dicha heterogeneidad (Cámara Rica et al., 1997).

Algo a tener en cuenta a la hora de trabajar con PAHs es la sensibilidad que estos tienen a la luz, llegando a descomponerse por fotoirradiación y oxidación (Plaza-Bolaños et al., 2010), por tanto, hay que mantener tanto las muestras como los extractos lo menos expuestos posibles a la luz, usando material color ámbar durante el mayor tiempo posible y cubriendo el resto de contenedores con material que bloquee la entrada de luz.

Una vez obtenida una muestra representativa para su análisis, la siguiente operación dentro del proceso analítico general es la preparación o tratamiento de muestra. Se debe de tratar de disminuir la manipulación de la muestra que conlleve a determinar el analito en ausencia de interferencias. De esta manera, aparte de resultar la determinación más rápida y económica, se minimizan los problemas de contaminación y pérdidas de analito. La extensión del proceso de preparación de muestra puede incluir etapas tales como aislamiento, purificación y preconcentración del analito. A continuación, se van a tratar las técnicas de extracción más utilizadas para en las metodologías para la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos y finalmente se describirá el uso de sistemas continuos de análisis para la preparación de muestra.

---

### I.2.1.1. Técnicas de extracción

Las técnicas de extracción a aplicar sobre las muestras van a depender de su naturaleza, normalmente se aplica una combinación de estas para obtener los analitos de la manera más pura posible. Esta variación depende en si la matriz es sólida o líquida y si hay presencia de lípidos o no, lo cual obliga a realizar normalmente una saponificación alcohólica para poder realizar una extracción de los PAHs de los lípidos y evitar el arrastrar al extracto parte de la fracción lipídica, ya que al ser estos unos compuestos sumamente apolares presentan una gran afinidad por las grasas, y que pueden provocar una reducción de la resolución y sensibilidad cromatográfica, además de dañar la columna del equipo.

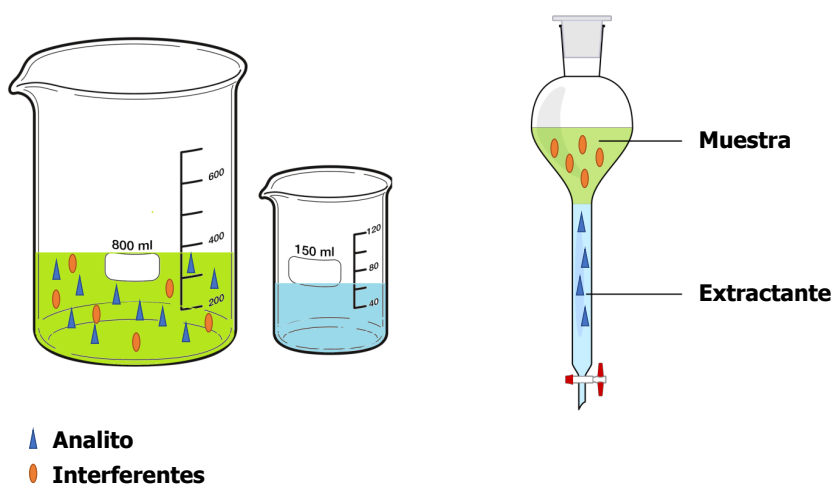
Las diferentes técnicas de extracción y limpieza que se ha encontrado en bibliografía corresponden a técnicas basadas en transferencia de materia como pueden ser la extracción líquido-líquido, extracción asistida por microondas, extracción asistida por ultrasonidos, extracción Soxhlet, extracción líquida presurizada, extracción en fase sólida, microextracción en fase sólida. Actualmente también se utiliza el método QuEChERS para llevar a cabo la extracción de analitos y limpieza de los extractos. Si nos basamos en los principios de la Química Verde, lo que se busca en las nuevas metodologías para preparación de muestras es la reducción del uso de disolventes orgánicos y la miniaturización de los procedimientos aplicados, por lo que se busca una combinación ideal para obtener unos buenos resultados además de ahorrar materiales, siendo beneficioso tanto económicamente como respetuoso con el Medio Ambiente. A continuación, se comentarán algunos de los aspectos más importantes relacionados con las técnicas de extracción más utilizadas para la preparación de muestras medioambientales y de alimentos.

#### I.2.1.1. Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido (LLE) se aplica para extracción de analitos de muestras en fase líquida, a esta primera fase se le añade otra fase también líquida e inmiscible, el fundamento principal en el que se basa esta extracción es el coeficiente de reparto o distribución de los analitos entre las dos fases en contacto, los compuestos tendrán una solubilidad diferente en ambas fases, presentando normalmente más afinidad por la fase que se ha añadido para realizar la extracción que en su medio natural. Normalmente esta afinidad suele ser de naturaleza polar y los analitos se desplazarán hacia el disolvente deseado, ambas fases pueden ser finalmente analizadas.

Esta técnica permite llevar a cabo extracciones de manera relativamente rápida a niveles traza, la selectividad y eficacia de este tipo de extracción reside en la elección de los disolventes puestos en contacto (Cela et al., 2003), normalmente esta técnica se aplica en combinación con una etapa de *clean-up* para eliminar los compuestos que se han coextraído junto a los analitos y que pueden interferir en la determinación cromatográfica.

El procedimiento experimental para este tipo de extracción consiste en poner en contacto la muestra en estado líquido que contiene los analitos junto a un volumen determinado (o varios de manera sucesiva) de otro disolvente, se agita y se dejan decantar ambas fases hasta que se observa una separación entre ellas adecuada (Figura I.5). En algunas ocasiones nos encontramos con que debido a la complejidad de la muestra pueden formarse emulsiones en la interfase (Yufra-Picardo et al., 2013), para ello se pueden añadir una pequeña cantidad de sales inorgánicas, las cuales ayudan a eliminar esta interfase poco definida y a aumentar el cociente de reparto en el caso de que queramos hacer una extracción desde una fracción inorgánica hacia otra orgánica.



**Fig. I.5.** Extracción líquido-líquido.

Factores que afectan al proceso de extracción son el pH y la solubilidad, lo cual afecta directamente a la selectividad de la técnica. Seleccionar un pH adecuado a la hora de realizar la extracción nos proporcionará un mejor resultado. Por otro lado, la correcta selección del disolvente dependerá de la afinidad de los analitos que posean hacia un determinado disolvente orgánico. Lo ideal es seleccionar uno con el cual los analitos tengan una alta afinidad y que a su vez éste sea inmisible o prácticamente inmisible con la otra fase. Una limitación de esta técnica puede ser la cinética del proceso, siendo en algunas ocasiones la extracción una cinética demasiado lenta hasta llegar al punto de equilibrio, lo que origina una pérdida de tiempo en esta etapa del análisis.

Con esta técnica de extracción se requiere el uso de un volumen elevado de disolventes orgánicos, por ello actualmente se está aplicando más a menudo la microextracción líquido-líquido, además se arrastran otras sustancias desde la matriz de la muestra hasta el extractante, lo cual hace que esta técnica se aplique como primer paso para la extracción y se combine con otras técnicas

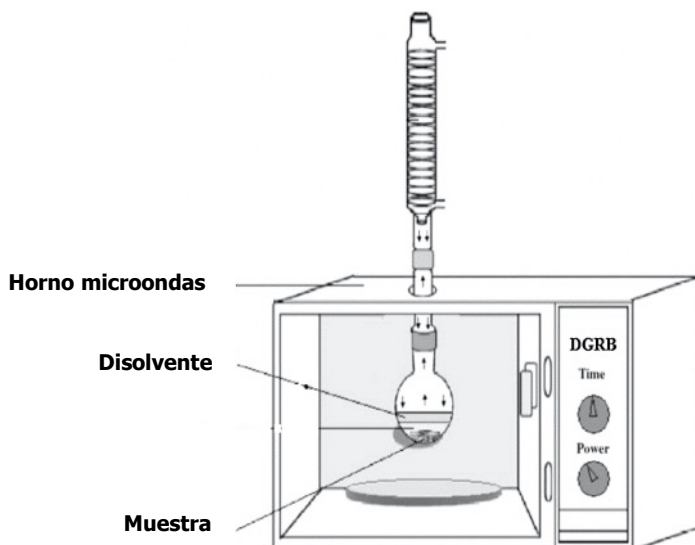
que nos permitan eliminar estas interferencias y que dejen el extracto limpio, como puede ser la cromatografía de permeación en gel (GPC) o la extracción en fase sólida (SPE).

En bibliografía normalmente encontramos la aplicación de la LLE junto a otras técnicas extractivas o de limpieza de muestra para la extracción de PAHs en diferentes tipos de matrices. En muestras acuosas se usa en combinación con SPE, dando unos datos de recuperación de entre el 66 y el 100% (Werres et al., 2009), la misma combinación para muestras de café han arrojado datos de recuperación de entre el 77 y 87% (Tfouni et al., 2013). El uso de LLE para extraer PAHs de aceites ha dado recuperaciones de entre el 70 y 110% (Zhou et al., 2016) y del 98 a 120 % en el caso de combinación con SPE (Yebrá-Pimentel et al., 2014).

#### I.2.1.2. Extracción asistida por microondas

La extracción asistida por microondas (MAE) utiliza la radiación electromagnética para la extracción de los compuestos en disolventes específicos. Esta radiación se encuentra en un intervalo de frecuencia de entre 300 y 3.000.000 MHz, provocando el desplazamiento de los iones y tránsitos rotacionales sin alterar la estructura molecular de la muestra (Cela et al., 2003). Esta técnica aumenta la temperatura del o de los disolventes puestos en juego para la extracción. Aplicando esta técnica se puede reducir el volumen de disolventes a la vez que aumenta la eficiencia y la selectividad de la extracción.

Para que se genere esta temperatura en el proceso de extracción es necesario que el disolvente posea unas determinadas propiedades dieléctricas. La energía de microondas (Figura I.6) es absorbida por moléculas que poseen un momento dipolar permanente, lo que hace que éstas roten, y esta rotación será la causante del aumento de temperatura (Cámara Rica et al., 1997). Por tanto, la elección de un disolvente adecuado es esencial para que la extracción asistida por microondas sea efectiva, a mayor momento dipolar del disolvente mayor será su capacidad para extraer los analitos de la matriz.



**Fig. I.6.** Esquema de un dispositivo de MAE. (Thirugnanasambandham et al., 2015)

Para la aplicación de esta técnica se suele utilizar recipientes transparentes a la radiación, ya sea en sistemas abiertos o cerrados. Para llevar a cabo esta extracción se pueden utilizar diferentes tipos de disolventes orgánicos respecto a su interacción con las microondas. Se puede usar un disolvente o mezcla de ellos que posea un alto momento dipolar y que va a interactuar directamente con las microondas, disolventes que presentan un momento dipolar intermedio e incluso disolventes que no tengan momento dipolar alguno y que no van a interactuar con esta radiación.

En el caso de los disolventes polares hay que tener en cuenta que se produce un aumento de temperatura causado por la rotación de los dipolos, provocando el aumento de la temperatura (hasta 200°C). Si la MAE se lleva en un sistema cerrado la temperatura que se alcanza es mayor que la de su punto de ebullición gracias a que la presión en el interior también aumenta. Estos dos factores son los determinantes a la hora de realizar una extracción satisfactoria, aumentando la solubilidad de los analitos y la cinética de desorción desde la matriz al disolvente (Cela et al., 2003).

El uso de disolventes que poseen una baja polaridad se requiere cuando tenemos analitos poco polares, como puede ser en el caso de los PAHs. En este caso el disolvente no se usa nada más que como un medio solubilizador de los analitos, y será la muestra la cual absorba la radiación microondas y aumente la temperatura, siempre y cuando la muestra nos lo permita. Generalmente esto es posible en muestras que posean cierta cantidad de agua en su matriz, la cual absorberá gran parte de la radiación.

Algunos autores han aplicado esta técnica de extracción sobre diferentes tipos de muestra, Li et al. (2011) lo aplicó sobre té, obteniendo unos datos de recuperación de entre el 78 y el 116 %. Otros autores la técnica de MAE la han aplicado en muestras de carne a la brasa y pescado ahumado, en combinación con digestión alcohólica y una etapa de limpieza y preconcentración posterior, alcanzando datos de recuperación 81,2 – 105,5 % (Ghasemzadeh-Mohammadi et al., 2012; Kamankesh et al., 2015). En aceites de oliva y girasol se ha utilizado también esta técnica, pero obteniendo resultados inferiores de recuperación (62-84 %), a pesar de estar combinada con una extracción en fase sólida (Alarcón et al., 2012).

#### I.2.1.3. Extracción asistida por ultrasonidos

Esta técnica de extracción consiste en utilizar ondas de ultrasonidos para agitar la muestra en contacto con un disolvente orgánico (Cela et al., 2003), ya sea mediante la colocación de la muestra en un baño de ultrasonidos o introduciendo en el medio muestra-extractante de una sonda que generará este tipo de ondas (Figura I.7).

La extracción asistida por ultrasonidos (UAE) se considera una técnica de extracción suave, ya que la radiación de ultrasonidos causa sobre los líquidos una serie de fuerzas que dan como resultado la vibración, presión y agitación, aunque mejora las extracciones en muestras que son muy heterogéneas pueden dar lugar a otras reacciones dentro de la misma matriz.

Esta técnica nos permite acortar el tiempo de extracción por el aumento de presión que se genera dentro de las muestras a extraer, lo cual favorece que el disolvente penetre mejor en la matriz y la extracción de los analitos sea llevada a cabo con mayor rapidez, además, al tener un incremento de la temperatura por efecto de la agitación, aumenta la solubilidad de los analitos y aumenta su difusión en el medio. El aumento de temperatura que se produce a través de esta técnica es mínimo, por lo que es una técnica adecuada para realizar extracciones de compuestos termolábiles.

Este tipo de extracciones se suelen llevar a cabo por etapas, para mejorar el coeficiente de reparto en la extracción, posteriormente se realiza una centrifugación de la muestra y el extractante para mejorar la limpieza de ambas fases. Después de las extracciones sucesivas se combinan los extractos y se acompaña de alguna etapa de limpieza (*clean-up*) y/o preconcentración. La presencia de agua en la muestra normalmente reduce el nivel de eficiencia, por lo que un preparamiento de muestra es necesario.

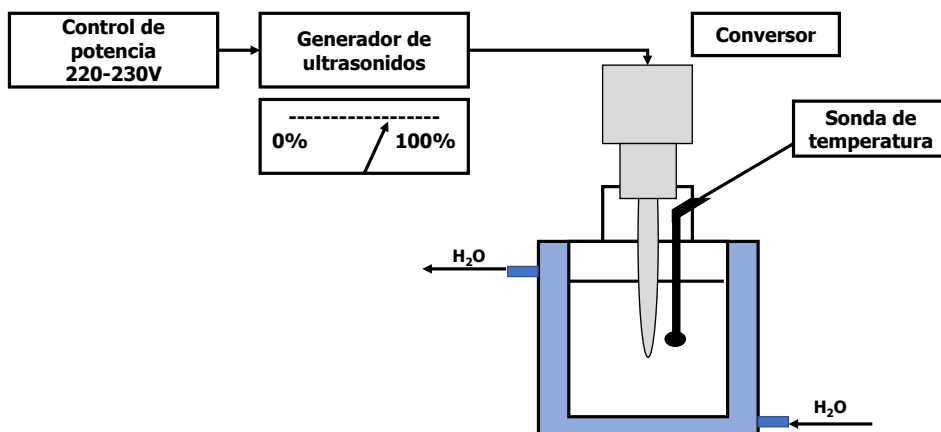


Fig. I.7. Esquema de una sonda de ultrasonidos.

Esta técnica ha sido aplicada en numerosas muestras sólidas para la extracción de PAHs de su matriz, algunas de ellas son el pan y pan chino frito en las que se han obtenido unos datos de recuperación entre 108 y 117 % (Rozentale et al., 2017) o entre 72 y 108 % (Li et al., 2016a) debido a la gran presencia de lípidos en las muestras de pan frito que hace que la eficacia en la extracción se inferior. En muestras de té se ha usado también la técnica de UAE en combinación con extracción en fase sólida para purificar los extractos, obteniendo resultados de recuperación entre 72 y 103 % (Lin et al., 2005).

#### I.2.1.4. Extracción Soxhlet

Es una de las técnicas más utilizada para la extracción de compuestos que están altamente unidos en la matriz de la muestra, debido a que la extracción Soxhlet se ayuda de un aumento en la temperatura para extraer los analitos de interés.

La muestra sólida debe ser pulverizada y colocada en un cartucho poroso, que se pondrá en la cámara del extractor Soxhlet, para la extracción se realizan una serie de destilaciones en continuo a través de la muestra sólida, enriqueciendo el disolvente con los analitos (Figura I.8). Esto permite que el disolvente está en contacto con la muestra en repetidas ocasiones, y al estar a alta temperatura la solubilidad de estos aumenta, originando una eficacia elevada en la extracción de los analitos.

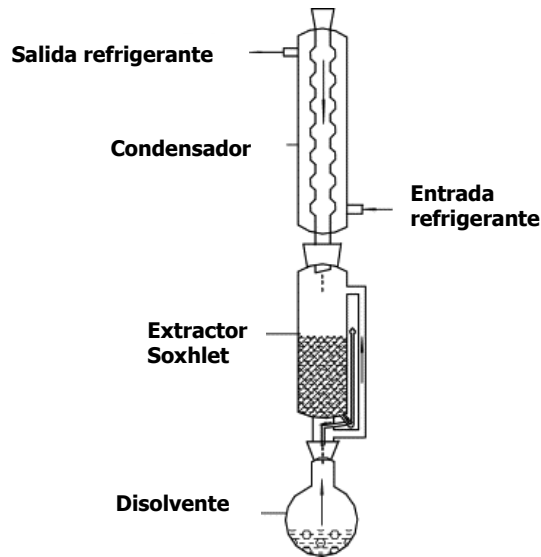


Fig. 1.8. Esquema de un extractor Soxhlet.

La desventaja de utilizar esta técnica reside en la necesidad de utilizar un gran volumen de disolventes orgánicos para poder llevar a cabo la extracción, el tiempo necesario para realizarla (entre 6 y 24 horas) (Cela et al., 2003), además los analitos se ven sometidos a largos tiempos de extracción a altas temperaturas, pudiéndose dar como resultado un proceso de degradación de los mismos. Esta técnica, a pesar de ser exhaustiva, no es selectiva y requiere el uso de una etapa de *clean-up* y preconcentración (Ridgway et al., 2007).

En las últimas décadas se está utilizando la extracción Soxhlet en combinación con otras técnicas como puede ser la extracción asistida por microondas, en la que la muestra es irradiada con este tipo de ondas para aumentar la eficacia del Soxhlet, reduciendo así el tiempo de extracción o el uso de altas presiones dentro del sistema para aumentar la temperatura y la solubilidad del disolvente, pero, como se ha mencionado antes, los compuestos termosensibles no se podrían obtener mediante esta técnica.

Su uso para la extracción de PAHs de matrices alimentarias no está muy extendido, esto es debido probablemente a que al llegar a tan altas temperaturas podemos activar algunas reacciones tanto de formación como de transformación de los PAHs, alterando los resultados finales. Liu et al. (2001) han utilizado esta técnica de extracción en muestras de arroz, con unos índices de recuperación bajos (60–85 %). Por otro lado, Essumang et al. (2012) la han aplicado en muestras de pescado, en este caso con mejores resultados (72–102 %).

### I.2.1.5. Extracción líquida presurizada

La extracción líquida presurizada (PLE), también denominada extracción acelerada con disolventes (ASE), es una técnica de preparación de muestra que hace uso de la combinación de altas temperaturas y presiones, hasta 200 °C y 2.000 psi para extraer los analitos de matrices sólidas de una manera más rápida y eficiente. Esta presión y temperatura es aplicada directamente sobre los disolventes orgánicos. Gracias al uso de altas presiones y temperaturas se incrementa la solubilidad y la transferencia de materia entre las fases y se facilita la ruptura del equilibrio analito-matriz (Cela et al., 2003). Estas altas temperaturas promueven el aumento de la movilidad de las moléculas del disolvente, lo cual provoca una bajada en su índice de viscosidad, que unido a las altas presiones permite que el disolvente penetre mejor en la matriz de la muestra y se realice la extracción de una manera mucho más rápida, además de mantener en estado líquido a los disolventes que a presión ambiente se deberían encontrar a esas temperaturas en estado gaseoso.

La aplicación de PLE es útil a la hora de extraer contaminantes orgánicos de muestras tanto ambientales como de alimentos (Figura I.9), se ha usado para la extracción de PAHs en diferentes tipos de matrices, así como de bifenilos policlorados (PCBs), plaguicidas organofosforados y carbamatos (Pitipanapong et al., 2007).

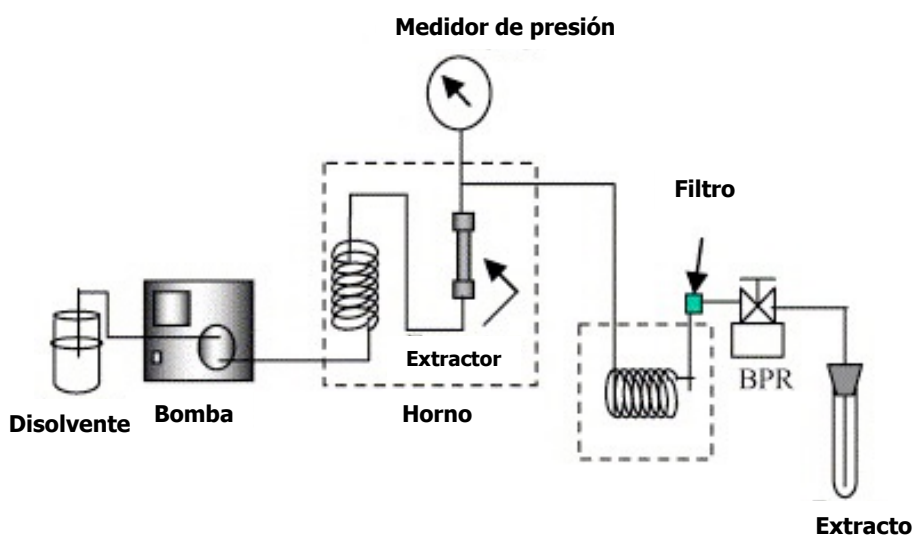


Fig. I.9. Esquema de un sistema de PLE (Pitipanapong et al., 2007).

Hay que tener en cuenta la naturaleza del disolvente orgánico que se va a emplear para realizar esta extracción, así como la de la muestra y los analitos objetos de estudio, una correcta

presión y temperatura y duración de los ciclos de extracción son determinantes para realizar satisfactoriamente la extracción de los analitos.

La PLE es una técnica relativamente rápida de llevar a cabo y en la que el uso de disolventes orgánicos se reduce, gracias al uso de temperaturas y presión altas. El extracto que se obtiene se puede evaporar y reconstituir para directamente realizar una determinación cromatográfica o bien puede ser tratado para su limpieza y preconcentración.

La técnica de PLE se ha utilizado para la extracción de hidrocarburos policíclicos aromáticos de alimentos en estado sólido. De esta manera, Martorell et al. (2012) llevaron a cabo un estudio sobre todo un menú diario en la comunidad de Cataluña aplicando esta técnica con recuperaciones de PAHs próximos al 73 %, obteniendo los peores resultados para la extracción de muestras de carne, pescado, aceites y productos lácteos (4,1-148 %). Por otro lado, se ha utilizado PLE para extraer PAHs de muestras de carne, pescado y marisco, con recuperaciones entre 73 y 120 % (Duedahl-Olesen et al., 2015).

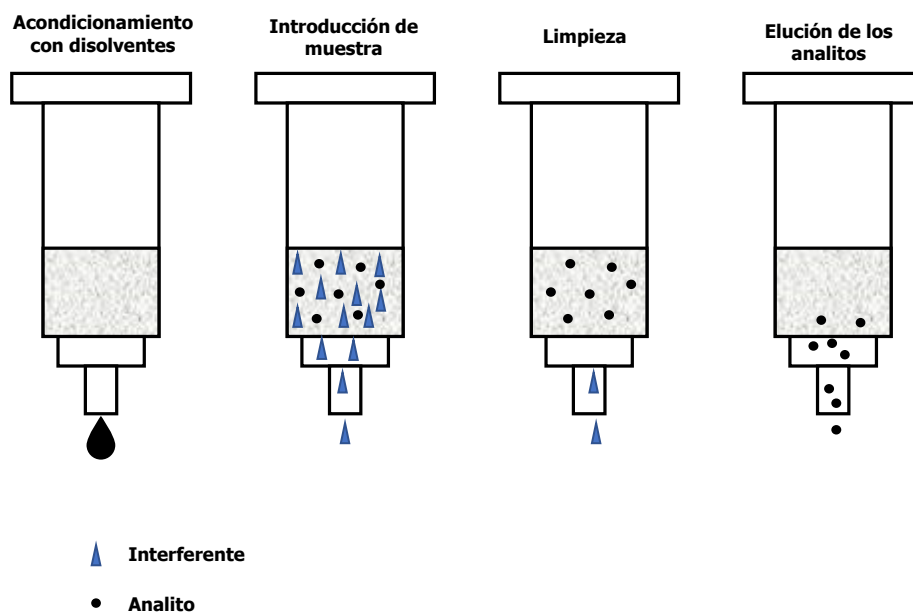
#### I.2.1.6. Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (SPE) es una extracción sólido-líquido en la que el sólido es un material sorbente y que se usa para retener a los analitos mientras se desecha la matriz de la muestra o el extracto que los contiene (Ridgway et al., 2007). La SPE se puede considerar una técnica extractiva por sí misma o usarse en combinación con otras técnicas como paso de limpieza de muestra y preconcentración para eliminar el efecto matriz.

Las fases que se utilizan en la SPE son similares a las utilizadas en los sistemas cromatográficos, en este caso la fase sólida es usada para retener los analitos objeto de estudio, los cuales tras eliminar totalmente la matriz en la que estaban contenidos van a ser de nuevo liberados y analizados mediante la técnica que corresponda (Cela et al., 2003). Todo esto se basa en la interacción fisicoquímica que hay entre la fase sólida y la fase líquida que se pondrán en contacto, para que la técnica sea efectiva. Por ello, el material sorbente deberá ser más afín a los analitos que la fase líquida para que cuando se le haga pasar a través de él, estos queden retenidos.

Algunos de los objetivos por los cuales se utiliza esta técnica es la capacidad que posee para preconcentrar los analitos que inicialmente están a nivel traza y la limpieza de la muestra mediante la eliminación de interferencias. Además, se pueden realizar fraccionamientos de la muestra, algo similar a lo que encontramos en cromatografía de permeación en gel, ya que en SPE también se pueden recoger diferentes fracciones de los compuestos o grupos de ellos, aunque lo normal es extraer sólo la primera fracción.

El procedimiento para llevar a cabo una extracción SPE consta de varias etapas (Figura I.10), inicialmente hay que acondicionar el sorbente que se haya seleccionado, dejando así preparada la fase sólida para que interactúe de mejor manera con los analitos. A continuación, se pasa la muestra a través del sorbente, los analitos son retenidos y la mayor parte de los interferentes y la matriz son desechados, el sorbente se seca usando una corriente de aire u otro gas para eliminar la mayor cantidad de residuo líquido posible y posteriormente se eluyen los analitos con un disolvente idóneo para ellos y para el sorbente. Comercialmente hay disponibles unos cartuchos y discos para realizar la extracción SPE, aunque se pueden preparar en el laboratorio por el analista.



**Fig. I.10.** Etapas para llevar a cabo la SPE mediante cartuchos comerciales.

Como se ha mencionado anteriormente, la selección de la fase sólida debe hacerse en función de las propiedades fisicoquímicas que poseen tanto los analitos como los diferentes materiales sorbentes.

Aspectos para tener en cuenta es la estabilidad química del material sorbente. Así, las sílices enlazadas son estables en un intervalo de pH de 2 a 7,5, por encima de 7,5 el sustrato puede disolverse en el medio mientras que por debajo de 2 el enlace sililéter es débil y se empiezan a perder grupos funcionales, perdiendo propiedad de adsorción (Cela et al., 2003). El resto de las fases poliméricas son estables en pH 1 a 14, pero algo a tener en cuenta es la estabilidad de los sólidos en los diferentes disolventes orgánicos que se van a usar en las etapas de elución y acondicionamiento. Mientras que las sílices enlazadas son químicamente estables frente a casi todos

los disolventes, los polímeros deben estar bien reticulados para evitar que se disuelvan o pierdan propiedades. Por otro lado, el tamaño de partícula y poro deben ser seleccionados correctamente, el tamaño de partícula suele oscilar entre los 15 y los 100  $\mu\text{m}$  de diámetro, siendo irregulares para permitir el flujo de disolventes a través de ellos. El tamaño del poro está influenciado por el tamaño de las moléculas a retener, normalmente se usan tamaños de poro de entre 60 y 400  $\text{Å}$ , para moléculas de peso molecular del orden de 15.000, no reteniendo a moléculas mayores que esta, si se necesitara retener moléculas mayores habría que usar otros sorbentes que pueden dar hasta 4.000  $\text{Å}$  de tamaño de poro.

El acondicionar el sorbente es una de las etapas más críticas durante la realización de SPE, ya que es necesaria para poder tener unos resultados reproducibles, sobre todo cuando se trabaja con fases no polares como puede ser el RP-C18. Esta etapa consiste en pasar un volumen de disolvente a través del material sorbente en varios pasos, dejando así el material sorbente en las condiciones ideales para poder retener a los analitos eficientemente y sin interferencias derivadas de extracciones anteriores.

Una de las principales razones para la elección de un determinado material sorbente es la selectividad y la capacidad que tengan de retener a los analitos diana. Es decir, la capacidad que tienen de retener a todos los analitos presentes en una muestra, para esto hay que tener en cuenta tanto el volumen original de la muestra a tratar como del volumen final al que deseamos llegar. Además de los analitos que se desean extraer hay que tener en cuenta que parte de las interferencias provenientes de la matriz, aunque sea una pequeña cantidad, también van a interactuar con el material sorbente y, por tanto, reducir la capacidad de retención, a mayor cantidad de material sorbente requerido, mayor será el volumen de disolventes orgánicos que necesitamos. La selectividad de un sorbente frente a una familia de analitos va a depender de la estructura química de los mismos, la propiedad del adsorbente (interacción en fase normal, fase reversa o iónica) y de la composición de la matriz de la muestra (Cela et al., 2003).

Los analitos y los diferentes adsorbentes pueden interactuar entre ellos siguiendo tres tipos diferentes de interacciones químicas: interacciones en fase reversa, interacciones en fase normal y por interacciones en fase de intercambio iónico. A continuación, se describirán algunas características importantes de estos tipos de interacciones:

∩ Interacción en fase invertida o fase reversa: Este tipo de interacción se da entre los enlaces C–H de los grupos funcionales del adsorbente y los enlaces C–H de los analitos mediante fuerzas de Van der Waals o de dispersión. La interacción en fase invertida es más común en moléculas orgánicas al tener la mayoría una estructura no polar, usando estas

interacciones no polares entre adsorbente y analito para su retención en la superficie de materiales como el octadecilsilano o polímeros orgánicos con anillos bencénicos. La extracción en fase reversa es algo menos selectiva que las que se realizan en fase normal o por intercambio iónico. No obstante, este tipo de extracción en fase reversa es mucho más efectiva a la hora de realizar separaciones de compuestos diferentes entre sí o que presentan una alta apolaridad. El sorbente más utilizado en este tipo de extracciones es el octadecilsilano (RP-C18). En el proceso de elución, la presencia de un disolvente o mezcla de ellos con carácter semi-polar o polar rompen las interacciones entre analito y adsorbente, mejorando el proceso.

Interacción en fase normal. Este tipo de separación se basa en interacciones de tipo polar entre analito y adsorbente, estas interacciones pueden ser por puentes de hidrógeno, por enlaces dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido, enlaces  $\pi$ - $\pi$  y demás interacciones en la que la carga de electrones no está distribuida de manera uniforme en la molécula, generando zonas de carga positiva y carga negativa. La interacción polar entre sorbente y analito se da con mayor facilidad en presencia de un disolvente apolar, mientras que la elución de los analitos se lleva a cabo usando disolventes polares para poder entrar en competición con el sorbente por los compuestos a extraer.

Interacción en fase de intercambio iónico. En el caso de la interacción en fase de intercambio iónico se da lugar entre analitos que poseen una carga eléctrica (positiva o negativa) y los grupos cambiadores del adsorbente con carga opuesta a la del analito (Cela et al., 2003). El pH de la muestra o del disolvente en el que inicialmente están los analitos va a influir en la adsorción de estos sobre el sorbente, ya que la carga de los compuestos se va a ver directamente afectada por el pH del medio. Para que la adsorción sea de manera correcta se deben cumplir dos requisitos, el primero es que tanto la muestra como el sorbente deben encontrarse a un pH donde ambos presenten la suficiente carga como para interactuar; y segundo, la matriz de la muestra no puede contener otras sustancias que posean la misma carga que el analito, ya que entraría en competición con él y evitaría la adsorción sobre el material sorbente. La fuerza iónica es un factor a tener en cuenta, mientras que una fuerza iónica baja facilita la retención de los analitos, en cambio cuando esta es alta la dificulta. Para la elución de estos compuestos se utilizan disolventes que están cargados con una concentración alta de iones desplazantes, el ion desplazante ocuparía el lugar de los analitos en el material sorbente y estos serían eluidos.

Para llevar a cabo la extracción en fase sólida existen diferentes tipos de materiales sorbentes, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas que mejor se adapten a la muestra y a los analitos que se deseen separar de ella.

Las sílices enlazadas están formadas por la reacción de organosilados con sílice activada, generando un material sorbente basado en el enlace silil-éter. Este tipo de sorbentes pueden ser de fase invertida o fase normal. El más usado en la fase invertida (reversa) es el octadecilsilano (C18), mientras que los octilsilano (C8) y etilsilano (C2) se usan en caso de tener moléculas de un alto peso molecular, en el caso de tener analitos con anillos aromáticos se pueden usar también sílices sustituidas con grupos ciclohexilsilano (CH) y fenilo.

Los absorbentes de intercambio iónico están formadas por una base de sílices o base polimérica a la que se le han añadido los grupos funcionales necesarios para una correcta adsorción. Actualmente se utilizan más los adsorbentes poliméricos, que son aquellos que están formados por copolímeros estireno-divinilbenceno. Estos sorbentes poliméricos tienen la ventaja de tener una mayor estabilidad y reproducibilidad en todo el intervalo de pH (1 a 14), al ser una superficie hidrófoba se va a aumentar la retención de compuestos polares mediante enlaces  $\pi$ - $\pi$ .

El correcto funcionamiento de este tipo de sorbentes se basa en el tamaño de partícula, área de la superficie, diámetro y volumen del poro, reticulación y distribución de las partículas. Algunos de los más usados son las resinas de Amberlita XAD-2 y XAD-4, Bond Elut PPL, Oasis HLB, Carbón grafitizado y LiChrolut EN, en la Tabla I.5 se resumen las características de los materiales sorbentes más comunes para la SPE de contaminantes.

**Tabla I.5.** Características físicas de algunos de los materiales sorbentes más utilizados para extracción de contaminantes mediante SPE.

Sorbente	Estructura <sup>a</sup>	Superficie específica (m <sup>2</sup> /g)	Diámetro de partícula (µm)
Amberlita XAD-1	PS-DVB	100	—
Amberlita XAD-2	PS-DVB	300	20–60
Amberlita XAD-4	PS-DVB	≥ 750	20–60
Amberlita XAD-7	MA-DVB	450	20–60
Amberlita XAD-8	MA-DVB	310	—
Isolute ENV+	PS-DVB-OH	1000–1100	90
LiChrolut EN	PS-DVB hc.	1200	40–120
Oasis HLB	DVB-VP	830	50–65
Oasis MCX	DVB-VP	—	30–60
PLRPS	PS-DVB	550	15–60
Strata X	PS-DVB cm	800	—
Gel de sílice	-Si-OH	—	15–35
Florisil	MgSiO <sub>3</sub>	—	50–200
Isolute NH <sub>2</sub>	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub>	—	45–65
RP-C18	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> CH <sub>3</sub>	—	40–63

<sup>a</sup>PS-DVB, poliestireno-divinilbenceno; F-PS-DVB, poliestireno-divinilbenceno con grupo funcional; DVB-VP, divinilbenceno-vinilpirrolidona; MA-DVB, metacrilato-divinilbenceno; hc, *pypercrosslinked*; cm, *chemically modified*.

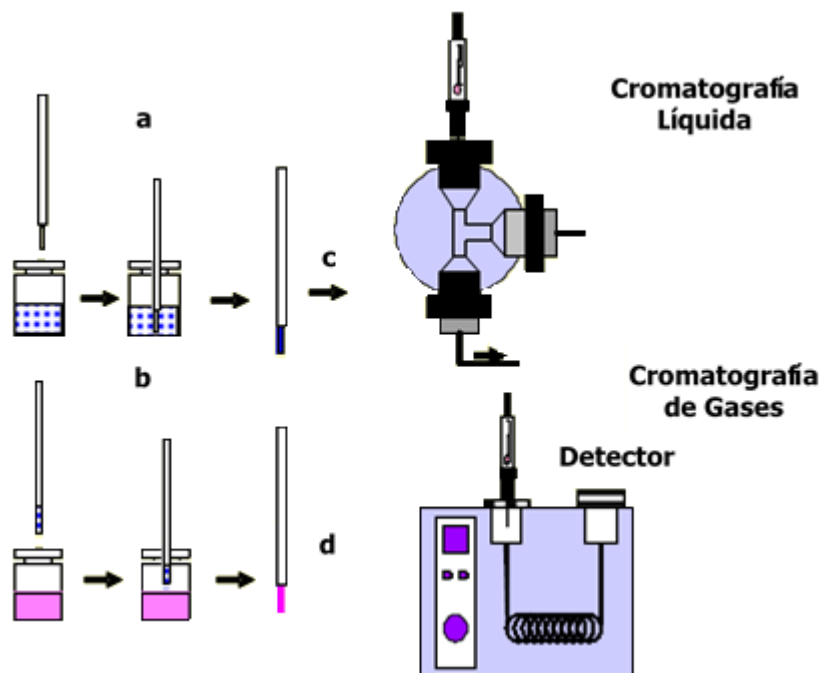
El uso de SPE para la extracción de PAHs está muy extendido, ya sea usada sola o en combinación con otras técnicas. Por ejemplo, Ma et al (2010) han utilizado esta técnica para la extracción de PAHs en aguas de grifo, mar y río, con porcentajes de recuperación entre el 70 y el 127 %. Werres et al. (2009) aplicaron la SPE en combinación con LLE para aguas de bebida y de río, obteniendo valores de recuperación entre 66 y 100 %. En alimentos es normalmente necesario el uso de combinación de técnicas de extracción. Así por ejemplo, Draboba et al. (2012) usaron LLE junto a la SPE para su uso sobre muestras de té, obteniendo valores de recuperación de 73 hasta 103 %. Duedahl-Olesen et al. (2015) la combinó junto a PLE y GPC para la determinación

de PAHs en carnes ahumadas, en ellas se obtuvieron unos valores de recuperación de entre el 73 y el 120 %. Esta técnica se ha aplicado también para el tratamiento de muestras de aceites vegetales (Bogusz et al., 2004) y pescados (Pizzini et al., 2016).

#### I.2.1.7. Microextracción en fase sólida

La técnica de microextracción en fase sólida (SPME) se basa en el uso de fibras de sílice fundida recubiertas con un material sorbente, esta fibra está unida a un pistón de acero inoxidable con una aguja, el émbolo de la aguja no se usa para aspirar la muestra, sino que se encarga de hacer salir la fibra al exterior o de volver a introducirla en el dispositivo (Cámara Rica et al., 1997). Esta técnica se utiliza debido a que muchas veces hay interacciones analito-matriz en SPE y hay una pérdida de la recuperación de los analitos, y para el uso directo sobre muestras sólidas, algo que no es posible en la extracción en fase sólida.

Esta técnica tiene dos etapas fundamentales, la primera es la de extracción de los analitos de la muestra hacia la fibra y la posterior desorción de los analitos para su determinación (Lord y Pawliszyn, 2000). La técnica de SPME surge para eliminar o reducir las limitaciones de SPE, ya que ofrece una rápida transferencia de masa durante la extracción y la desorción, previene las obstrucciones que se pueden producir en la SPE, reduce o elimina el consumo de disolventes y facilita el manejo e introducción directa en los instrumentos analíticos de medida (Figura I.11). Tiene limitaciones relacionadas con el coste y la reproducibilidad, principalmente.



**Fig. I.11.** Esquema del proceso de SPME acoplada a CL o a GC; (a) inmersión directa; (b) espacio de cabeza; (c) desorción con disolventes; (d) desorción térmica.

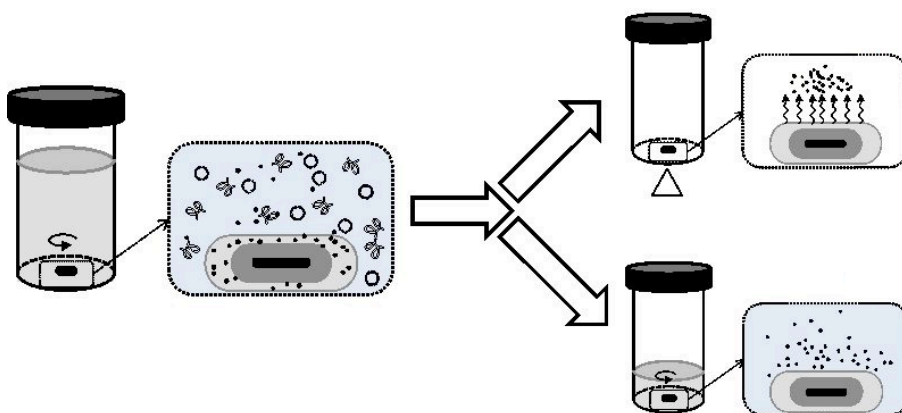
La técnica de SPME ha sido utilizada por diferentes autores para la extracción de PAHs presentes en muestras de aguas y alimentos. Por ejemplo, Loh et al. (2013) han usado la SPME en combinación con UAE para la extracción de PAHs presentes en muestras de té, obteniéndose valores de recuperación satisfactorios (91-107 %). Vichi et al. (2005, 2007) han utilizado la técnica de SPME con espacio de cabeza para el análisis de aceites de oliva con recuperaciones hasta del 128 %. Cheng et al. (2013) utilizaron la SPME para el análisis de aguas de río, con porcentajes de recuperación próximos al 90 %.

#### I.2.1.8. Extracción por adsorción sobre barra agitadora

La extracción por adsorción sobre barra agitadora (SBSE) se basa en el uso de una barra de agitación magnética recubierta por una capa de polidimetilsiloxano (PDMS) de entre 0,5 y 1 mm de espesor (Kawaguchi et al., 2013). El proceso de extracción se basa en el equilibrio PDMS-agua.

Los recubrimientos a usar en este tipo de barras deben ser químicamente inertes, ya que estos polímeros van a estar en contacto continuo con oxígeno, ya sea ambiental o de las muestras, por lo que puede ser rápidamente oxidado y dar lugar a un cambio en las propiedades poliméricas del recubrimiento. También hay que tener en cuenta la presencia de ácidos y bases, proteínas y lípidos, estos últimos pueden obturar la superficie del recubrimiento y evitar una correcta extracción.

En el proceso de extracción (Figura I.12) se ponen en contacto la barra agitadora junto a la disolución mediante inmersión. En el caso de la separación por inmersión la barra de agitación recubierta se introduce en un vial junto a la muestra y se agita bajo control de las condiciones físicas y químicas, después de completar el tiempo de extracción la barra de agitación se saca de este vial, en esta etapa se puede limpiar usando agua destilada si el procedimiento lo requiriera, se elimina el agua y se procedería al proceso de desorción de la superficie del recubrimiento mediante el uso de disolventes, cambios de temperatura, etc. (Rodríguez et al., 2013).

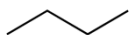


**Fig. I.12.** Esquema del funcionamiento de la extracción SBSE (Rodríguez et al., 2013).

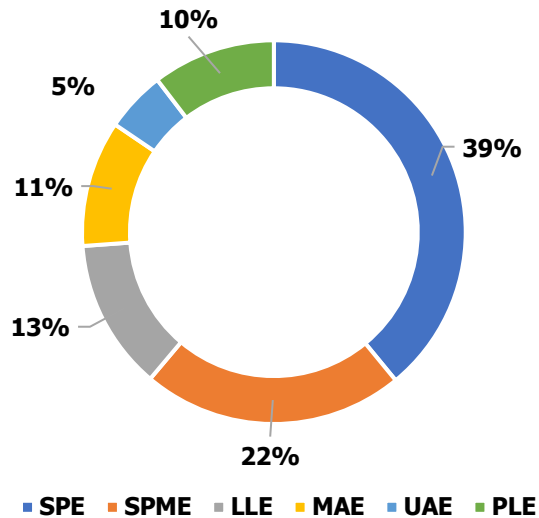
El proceso de desorción de los analitos que han quedado atrapados en la matriz polimérica de la barra de agitación, previo a una determinación cromatográfica, se puede llevar a cabo mediante una desorción térmica (TD) o líquida (LD) (Camino-Sánchez et al., 2014). Para la desorción térmica, los analitos son extraídos de la matriz mediante el aumento de la temperatura, normalmente esto se asocia a la determinación mediante cromatografía de gases gracias al uso de un espacio de cabeza, que permitirá introducir directamente los analitos. Si la desorción es líquida la barra magnética recubierta se introduce en un disolvente, o mezcla de ellos, y se llevará a cabo la desorción química de los analitos en el disolvente, en este caso hay que tener en cuenta la

compatibilidad del disolvente tanto con los analitos como con la matriz polimérica que recubre la barra.

El uso de SBSE para la extracción de PAHs en alimentos se ha realizado sobre muestras de té que han sido preparadas y encontrándose en estado líquido. Así, Zuin et al. (2005) recurrió posteriormente a una desorción líquida al realizar una determinación por cromatografía de líquidos de alta resolución. En cambio, Cacho et al. (2014) para el mismo tipo de muestras recurrieron a una desorción térmica en espacio de cabeza acoplada a un cromatógrafo de gases espectrómetro de masas.



Para concluir con las técnicas de extracción, en la Figura I.13 se incluye los resultados de un estudio bibliográfico sobre las técnicas más utilizadas para la extracción de PAHs en muestras ambientales como el agua y de alimentos. Como se puede observar, la más aplicada es la extracción en fase sólida, seguida de la microextracción en fase sólida y una técnica clásica como es la extracción líquido-líquido, aunque recientemente se están empezando a aplicar otras técnicas, tales como la extracción asistida por microondas o por ultrasonidos para este tipo de analitos.



**Fig. I.13.** Porcentaje de aplicación de las distintas técnicas extractivas para hidrocarburos policíclicos aromáticos en muestras ambientales y alimentos en las publicaciones aparecida en el periodo 2010-2017. [Fuente ScienceDirect; palabras clave: “PAHs”, “environmental samples”, “food samples”, “solid-phase extraction” (SPE), “solid-phase microextraction” (SPME), “liquid-liquid extraction” (LLE), “microwave assisted extraction” (MAE), “ultrasonic assisted extraction” (UAE), “pressurized liquid extraction” (PLE)]

### I.2.1.9. Método QuEChERS

El método QuEChERS [acrónimo inglés de Quick, Easy, Cheap, Efective, Rugged y Safe (rápido, fácil, económico, eficaz, robusto y seguro)] para la preparación de muestras presenta una serie de características como son el ser una técnica rápida y segura de llevar a cabo, además de evitar el uso de disolventes halogenados (Schmidt et al., 2016). Este método se ha venido aplicando con éxito sobre compuestos polares, sobre plaguicidas y análisis de residuos. Mediante la introducción de buffers para el control de pH y el uso de sales de citrato se ha conseguido implementar esta técnica para la extracción de compuestos con distintas polaridades.

En este método se combinan dos técnicas (LLE y SPE). En la primera etapa se suele hacer uso de disolventes como el acetonitrilo para extracción de los compuestos de una muestra acuosa, mientras que en la segunda etapa se suele usar un sorbente para eliminar los compuestos no deseados y que han sido coextraídos junto a los analitos, normalmente este sorbente suele ser una amina secundaria primaria (PSA).

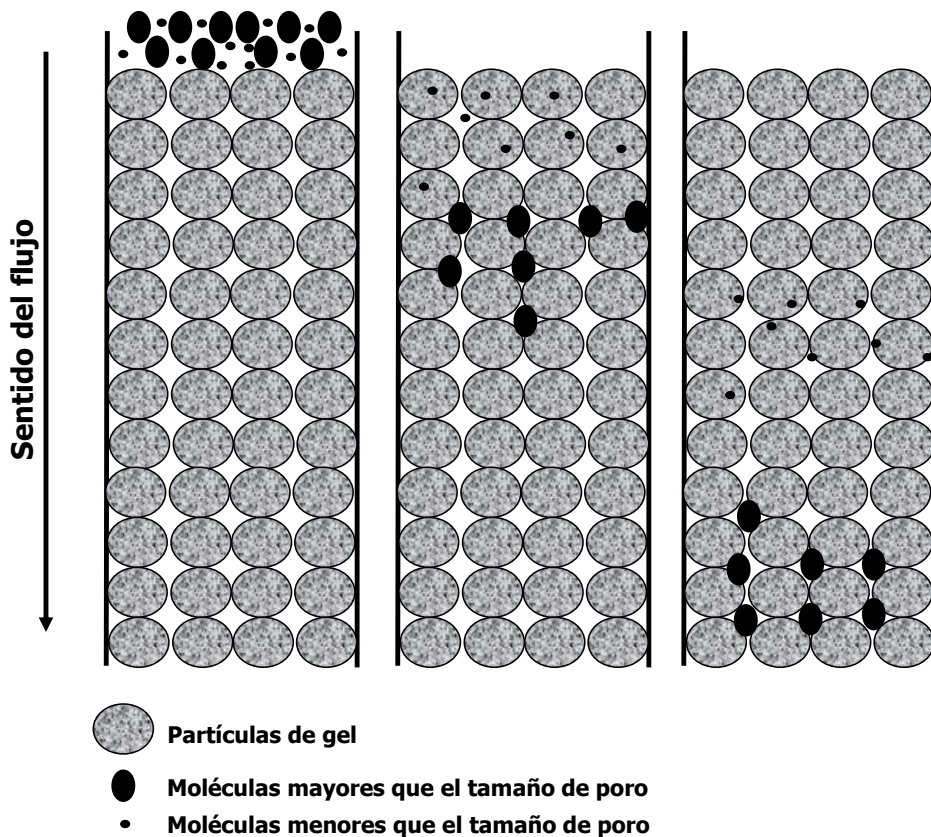
Para la extracción de PAHs mediante el uso de esta técnica los disolventes usados por algunos autores han sido mezclas de acetona, isooctano y acetato de etilo, lo cual incrementa la selectividad por estos analitos apolares además del uso de PSA para el paso de extracción con sorbentes, en algunos casos se usa combinación de este junto a  $\text{MgSO}_4$  y sílica gel en fase reversa (RP-C18). Aunque se pueden obtener recuperaciones entre el 70 y 120 %, los límites de detección que se asocian a esta técnica de extracción y posterior determinación cromatográfica se encuentran a niveles de  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  o  $\mu\text{g L}^{-1}$  (González-Curbelo et al., 2015). Por ejemplo, el método QuEChERS se ha aplicado sobre muestras de té en las cuales Sadowska-Rociek et al. (2014) obtuvieron valores de desviación relativa estándar (RSD) próximas a 20 % y Princemaille et al. (2014) consiguieron unos valores de recuperación entre el 52 y 82 %. Este método de preparación de muestras también se ha utilizado para extraer PAHs en muestras de arroz con una recuperación entre 60 y 106 % (Escarrone et al., 2014).

### I.2.1.10. Cromatografía de permeación en gel

La cromatografía de permeación en gel (GPC), también se puede encontrar en la bibliografía como cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) y se puede utilizar en la etapa de preparación de muestras de alimentos. Esta técnica se basa en la separación de las diferentes especies o analitos dependiendo de su tamaño. Es una técnica aplicada en los procesos de limpieza de extractos para compuestos de alto peso molecular.

La separación se lleva a cabo mediante la exclusión de las moléculas por tamaño. Para ello es fundamental la selección de una fase estacionaria que cumpla el requisito de tener el mismo

orden de tamaño que la especie a separar, estos analitos van disueltos en una fase móvil junto al resto de compuestos de los que los queremos separar, normalmente esta fase estacionaria es de naturaleza polimérica o de sílice, este proceso se encuentra representado en la Figura I.14. Entre la fase estacionaria y la fase móvil no existe ningún tipo de interacción química, en este tipo de separación sólo entra en juego el tamaño de las diferentes moléculas presentes en el extracto, la fase móvil tiene como fin el desplazamiento de los compuestos por la columna. La elección de la fase móvil debe hacerse siguiendo la solubilidad que presenten los analitos, la viscosidad y la compatibilidad con el relleno que se haya seleccionado (Rouessac et al., 2003).



**Fig. I.14.** Mecanismo de separación mediante cromatografía de permeación en gel.

Esta técnica se ha aplicado en combinación con otras para el tratamiento de muestras de carnes y pescados principalmente. Algunos autores han combinado la GPC junto a SPE para la extracción de PAHs en carne de bovino, ternera y salmón (Viegas et al., 2012). Otros investigadores han usado la combinación de MAE, SPE y GPC para extraer PAHs de carnes y salchichas ahumadas procedentes de Italia (Purcaro et al., 2009). O bien la combinación de PLE, GPC y SPE para la extracción de este tipo de contaminantes en carne asada en barbacoas (Duedahl-Olesen et al., 2015).

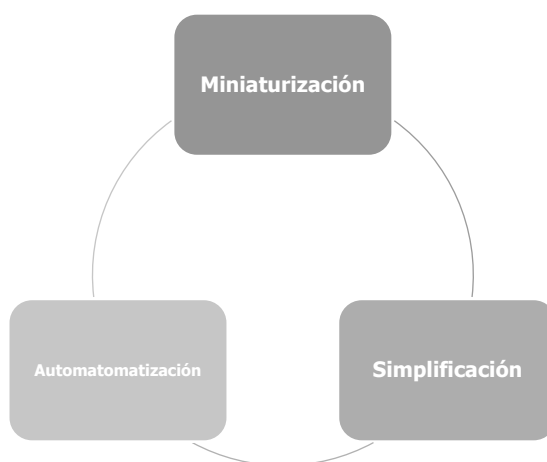
Por otra parte, Ballesteros et al. (2006) han combinado la LLE y GPC para la extracción de PAHs y plaguicidas en diferentes tipos de aceites de oliva, consiguiendo unos resultados de precisión y exactitud satisfactorios (RSD: 3–7.8%; recuperación: 84–110%).

### I.2.2 Sistemas continuos de análisis para la preparación de muestra

En las dos últimas décadas, las tendencias del área de la Química Analítica es el desarrollo de metodologías con las que se consiga una selectividad y sensibilidad satisfactorias en tiempos reducidos de análisis y con un consumo reducido tanto de muestras como de reactivos, que sean compatibles con la Química Verde (De la Guardia y Garrigues, 2012).

Para cubrir todos estos requisitos se han aplicado la simplificación, miniaturización y automatización en los procedimientos analíticos con el fin de reducir la intervención del analista, disminuir los tiempos de análisis y usar las mínimas cantidades de muestras y reactivos. Estas tres tendencias no se trabajan de manera aislada, sino que van relacionadas íntimamente entre ellas, sin una no se puede dar el resto de ellas (Figura I.15).

Cuando un método manual se transforma en un método automático casi siempre implica cierto grado, en mayor o menor medida, de miniaturización y simplificación (Valcárcel y Cárdenas, 2000). La simplificación de un proceso casi siempre requiere el uso de módulos y, por consiguiente, la reducción de la intervención del analista durante este proceso, siendo esto una miniaturización y una automatización del análisis.



**Fig. I.15.** Las tres tendencias en Química Analítica trabajan de forma directa entre ellas, sin la presencia de una de estas tendencias las otras no son posibles.

Los métodos de análisis automáticos se han desarrollado debido al elevado número de muestras que se tienen que analizar en la mayoría de los casos en los laboratorios y a la necesidad de la mínima involucración del analista (Cerdá, 2006). Un método totalmente automatizado es difícil de implementar, ya que los pretratamientos de muestras suelen ser etapas sistemáticas que requieren de la intervención humana. La automatización en los procesos analíticos surge como consecuencia de la creciente necesidad que existe en áreas como salud, Medio Ambiente o alimentación, de incrementar la capacidad para llevar a cabo un gran número de controles analíticos eficaces que permitan obtener resultados más precisos, específicos y con mayor rendimiento. Los objetivos de la automatización en Química Analítica deben ser coherentes, por una parte, con sus fines y objetivos y, por otra, con las ventajas estratégicas generales que implica la sustitución de la participación humana en los procesos de una organización:

- ❖ Procesado de alto número de muestras
- ❖ Aumento de la frecuencia de muestreo
- ❖ Mayor sensibilidad y selectividad
- ❖ Reducción del consumo de muestra y reactivos
- ❖ Reducción de errores y aumento de la rentabilidad
- ❖ Seguridad del personal y medioambiental
- ❖ Validación de técnicas o metodologías

Todo esto hace que la automatización en el ámbito de la Química Analítica sea importante, teniendo un impacto directo sobre los ensayos analíticos en cuanto a la reducción de costes por el uso de materiales y tiempo, además de reducir la implicación del analista en los procesos, aumentando la productividad y reduciendo el posible impacto de errores humanos.

Skeegs implementó en 1957 lo que se conoce como el análisis en flujo segmentado (SFA) como respuesta al aumento de ensayos que había que realizar en los laboratorios y que requerían de cada vez mayor número de personas implicados en ellos. Esta fue la primera técnica de flujo aceptada universalmente (Cerdá, 2006). Estos sistemas fueron una solución mecánica al proceso de automatización en los métodos analíticos. En los sistemas de flujo se pueden distinguir dos clasificaciones respecto a la forma de introducción de muestra y a la introducción de burbujas: flujo segmentado y flujo no segmentado.

Los sistemas de flujo segmentado introducen las muestras de manera secuencial, siendo aspiradas y espaciadas entre sí por burbujas de aire para evitar el *carry-over* entre muestras y reactivos, limpiando las paredes de los conductos. El sistema de análisis en flujo segmentado se basa en la utilización de una bomba peristáltica, la cual aspira la muestra y los reactivos, unos conductos (tubos) de plástico a través estas muestras y reactivos viajan y un detector. Las muestras

son segmentadas inyectando burbujas de aire que deben eliminarse antes de pasar al detector, estas burbujas evitan la contaminación cruzada entre muestras, compactan la muestra en los conductos evitando que se expanda y generan un flujo turbulento que homogeniza la muestra y los reactivos. Los inconvenientes de la SFA es la compresión que generan estas burbujas, y la necesidad de eliminarlas antes de la detección, también disminuye la eficacia en las etapas de separación y la miniaturización del método.

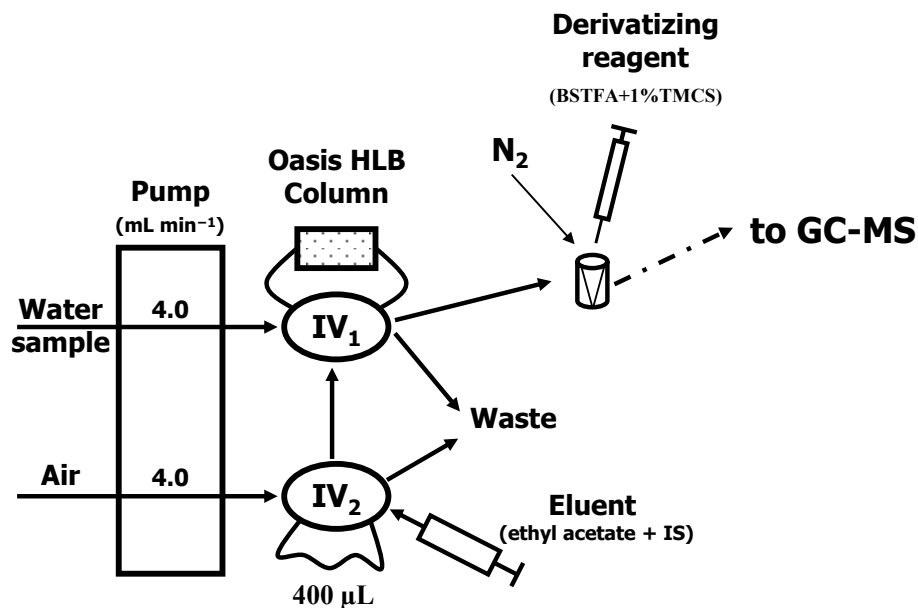
Los sistemas de flujo no segmentado no presentan burbujas de aire en el sistema, las muestras son introducidas de manera secuencial en el analizador mediante inyección o por corriente de un portador. La técnica más aplicada actualmente es el análisis por inyección en flujo (FIA). Aparentemente es una técnica similar al análisis en flujo segmentado, pero diferente tanto en la práctica como en los resultados que se obtienen de ella. Los componentes básicos son similares a los de SFA, una bomba peristáltica que mueve tanto reactivos como muestras y una serie de conducciones que nos llevan hacia un detector. La diferencia es que en este caso una alícuota de la muestra es aspirada (a volumen constante) y llevada a través de válvulas de inyección, haciéndola confluir con los diferentes reactivos necesarios para el método analítico (Cerdá, 2006). Las longitudes, velocidades y tamaños de las diferentes partes de estos sistemas se fijan atendiendo a las necesidades del método y de la muestra.

En esta técnica se usan flujos laminares, eliminando el peligro de contaminar una muestra con otra. El FIA es una técnica muy versátil que permite la aplicación de diferentes metodologías, tiene una facilidad relativa de implementación, ya que cada uno puede construir su propio sistema y que va a adaptarse a los problemas que deseen resolver.

Una de las etapas que más se han automatizado en los procesos analíticos gracias a FIA es la preparación de muestra. Se han desarrollado multitud de sistemas continuos con el fin de reducir la intervención humana, tiempos de análisis y consumo de reactivo y muestras. Esto además repercute en un aumento de precisión y exactitud en las metodologías.

Algunos autores han desarrollado sistemas continuos para la extracción en fase sólida mediante la inclusión de una columna rellena de material sorbente en el bucle de una válvula de inyección, con ello realizan una preconcentración y eliminación de interferencias en la determinación de compuestos orgánicos en multitud de muestras. Jurado-Sánchez et al. (2014) utilizaron este tipo de montaje para la SPE de ácidos perfluoroalquilo de muestras de orina. Para ello, estos investigadores emplearon una columna empaquetada de LiChrolut EN como sorbente, y llevaron a cabo la determinación mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS). Estos sistemas también han sido utilizados para la extracción de hormonas y productos farmacéuticos en diferentes tipos de muestras de aguas (grifo, piscina, pozo, río, pantano

y aguas de desecho) (Azzouz et al., 2010). En este caso se ha empleado una columna rellena del sorbente Oasis HLB y la determinación de estos contaminantes se ha llevado a cabo mediante GC-MS. En la Figura I.15 se puede observar un esquema del sistema continuo utilizado para la extracción de estos tipos de analitos en aguas.



**Fig. I.15.** Esquema del sistema continuo para la determinación de productos farmacéuticos y hormonas en muestras de agua (Azzouz et al., 2010).

La miniaturización en Química Analítica es una importante área de trabajo y desarrollo que permite la consecución de diversos objetivos, estos objetivos se han clasificado normalmente en tres grandes grupos: genéricos, básicos y específicos, siguiendo además ese orden jerárquico, un objetivo específico se engloba dentro de uno básico que finalmente contribuye a alcanzar uno general.

Estos objetivos que se pretenden conseguir para la miniaturización en los procesos analíticos comprenden multitud de facetas. El muestreo está directamente implicado en la miniaturización, la posibilidad de trabajar con micromuestras o la capacidad de monitorizar en línea evitando el muestreo son ejemplos de esta miniaturización (Figura I.16). Los equipos también han sufrido un proceso de miniaturización, reduciendo el espacio que ocupan y otorgando la posibilidad de ser transportados a la zona de trabajo de campo, mejorando una de las propiedades analíticas

complementarias, la rapidez, además de una reducción de costes. Por último, los analistas también se ven beneficiados de esta miniaturización reduciendo su implicación en el proceso analítico, además de una reducción en el uso y exposición de estos a residuos tóxicos (Valcárcel y Cárdenas, 2000).



**Fig. I.16.** Objetivos genéricos (A), básicos (B) y específicos (C) que pueden alcanzarse al miniaturizar herramientas y procesos analíticos.

## **I.3 Técnicas para la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos en aguas y alimentos**

En este apartado se van a describir las principales técnicas analíticas utilizadas para la determinación de PAHs en aguas y alimentos, entre las que se incluyen las técnicas cromatográficas, la espectrometría de masas y su acoplamiento. Finalmente, se tratarán algunas de las otras técnicas que también se han utilizado hasta la fecha para la determinación de PAHs en estos tipos de matrices.

### **I.3.1 Técnicas Cromatográficas**

En esta parte de la Memoria se incluyen los aspectos más relevantes de las técnicas de cromatografía de gases (GC) y de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y su aplicación para la determinación de PAHs en muestras de agua y de alimentos.

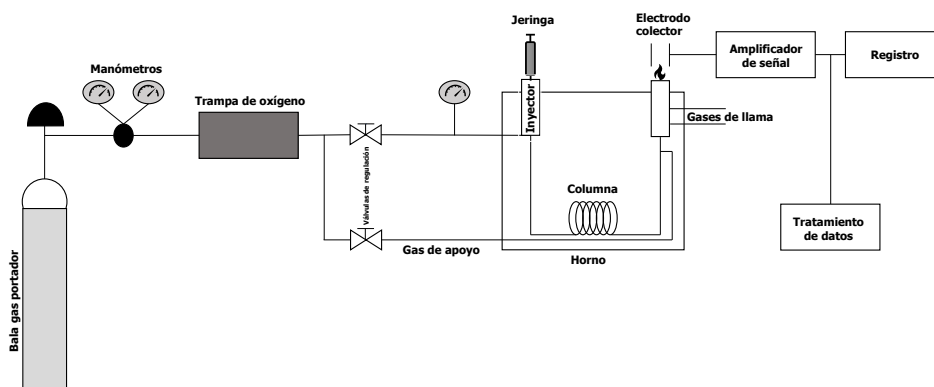
#### **I.3.1.1 Cromatografía de gases**

La cromatografía de gases es el método de elección para la separación de las sustancias volátiles y térmicamente estables (Cela et al., 2003). Es una técnica de las más versátiles y potentes en el laboratorio analítico, proporcionando una alta resolución y sensibilidad

El mayor inconveniente de la cromatografía de gases lo encontramos en la temperatura de trabajo, la mayoría de columnas de separación cromatográfica trabajan en un intervalo de temperaturas máximas de entre 350 y 400 °C, esto limita los solutos que se pueden volatilizar eficazmente a pesos moleculares por debajo de 1.000. Como respuesta a esta problemática se aplica la derivatización a las sustancias objeto de estudio, para reducir el punto de ebullición de estas especies o hacerlas térmicamente estables.

La separación en GC se lleva a cabo principalmente basado en dos principios: adsorción y partición cromatográfica. En la cromatografía de adsorción, la separación se obtiene cuando los analitos tienen diferente afinidad por una fase sólida estacionaria, en la cromatografía de partición la fase estacionaria es un líquido no volátil y la separación se obtiene si los analitos tienen una diferente distribución entre la fase móvil y estacionaria (Figura I.16).

La fase móvil normalmente es un gas que se encarga de transportar los analitos a través de la columna cromatográfica, el gas se comporta de manera inerte frente a los analitos y no interviene en la separación cromatográfica. El gas que se use debe ser de la mayor pureza posible y evitando la presencia de trazas de oxígeno, agua e hidrocarburos (Lundanes et al., 2014), siendo además un criterio de selección del gas portador su compatibilidad con el detector y el coste que conlleva.



**Fig. I.16.** Esquema de un cromatógrafo de gases.

### I.3.1.1.1 Columna cromatográfica

Las separaciones en GC se pueden llevar a cabo en columnas empaquetadas o capilares. La separación dentro de estas columnas se va a llevar por medio de diferencias de selectividad entre la fase estacionaria y los analitos, actualmente se dispone de una amplia gama comercial que adapta los materiales de la fase estacionaria en función de las características de los compuestos a separar.



Columnas empaquetadas o cerradas

Este tipo de columna se construye en el propio laboratorio utilizando tubos de materiales como son el cobre, acero inoxidable, aluminio y vidrio. Estos conductos tienen unas dimensiones de entre 2 y 5 milímetros de diámetro interno y una longitud de entre 30 cm y 5 metros. En su interior se depositará la fase estacionaria junto a un soporte sólido (Cela et al., 2003).



### Columnas capilares o abiertas

En el caso de las columnas capilares los materiales usados para su construcción son tubos de sílice fundida o vidrio de borosilicato, siendo las primeras las más utilizadas. Actualmente se distribuyen tres tipos diferentes de columnas capilares: la columna capilar de paredes impregnadas (WCOT), columnas capilares con soporte impregnado (SCOT) o de capa porosa (PLOT).

Las columnas WCOT con las más utilizadas, este tipo de columna la fase estacionaria es un líquido que ha sido recubierto como una fina capa (normalmente de espesor 0,25 micras) en la cara interna de la columna cromatográfica, están fabricadas a partir de sílice pura a la que se le ha eliminado cualquier resto metálico, debido a que la columna en sí es frágil se suele aplicar un recubrimiento de poliimida, lo cual permite que se enrolle sin ser dañada, gracias a la reactividad que poseen, flexibilidad y resistencia son las más utilizadas, se suelen aplicar para cromatografía de partición.

Las columnas del tipo PLOT contienen una capa porosa sobre la cara interior de la columna y se usa para cromatografía de gases por adsorción, donde la capa porosa actúa como fase estacionaria. Las de tipo SCOT poseen una fase líquida estacionaria que ha sido aplicada sobre una capa porosa, la ventaja del tipo SCOT sobre la WCOT es su mayor capacidad de separación en una muestra, pero tiene menor eficiencia.

La fijación de la fase estacionaria a la columna debe de ser estable térmicamente y químicamente y ésta debe de ser de baja volatilidad. Algunos de los materiales más utilizados como fase estacionaria en este tipo de columnas son el polidimetilsiloxano para compuestos de poca polaridad, el poli(fenilmetildifenil)siloxano para ésteres metílicos de ácidos grasos, compuestos halogenados y PAHs, poli(fenilmetil)siloxano para plaguicidas, glicoles, esteroides y polietilenglicol para compuestos polares, alcoholes y aceites esenciales (Cela et al., 2003).

Mediante el entrecruzados de los polímeros en la fase estacionaria de la columna se evita que el material de empaquetamiento se pierda por el aumento de temperatura y arrastre del gas portador durante el análisis cromatográfico.

#### I.3.1.1.2 Control de la temperatura en el horno cromatográfico

La temperatura del horno cromatográfico se debe de controlar con precisión mediante el software y hardware asociados al equipo cromatográfico y debe de coincidir con la temperatura real de la columna cromatográfica (Dabrio, 2000). El flujo del gas portador que pasa a través de la columna y que se encarga de llevar a los analitos será variable debido al cambio de temperatura y,

por consecuencia, de su viscosidad, aunque el mayor cambio sobre la retención de los analitos en la columna viene dado por el volumen de retención de esta.

En el caso de haber hecho una correcta selección de la columna y esta posea una buena selectividad sobre los analitos a separar, la elución se llevará a cabo por orden en función de los puntos de ebullición de los diferentes compuestos. En cromatografía de gases se puede trabajar de manera isocrática (temperatura constante) o mediante rampas de temperatura, lo cual ayuda a reducir los tiempos de análisis. El uso de una temperatura constante en cromatografía de gases requiere que la muestra no posea un gran número de analitos a determinar y que no posean unas temperaturas de ebullición similares, lo cual se da con compuestos de la misma familia, ya que presentarían problemas de coelución, por esto y el mayor tiempo de análisis que se consume lo más aplicado es la cromatografía de gases con rampas de temperaturas programadas.

La programación de temperaturas permite variar la temperatura del horno cromatográfico a lo largo de análisis en función del tiempo. Esta variación de temperatura hace que los factores de retención de los analitos que circulan a través de la columna varíen, al utilizar este tipo de programas de temperatura mejoramos la resolución de los picos del cromatograma resultante, en este caso suelen ser más altos y estrechos que si se realizaran con un programa de temperatura constante, evitando así casos de solapamiento entre picos de diferentes analitos y, por tanto, aumentando la eficacia en la separación.

#### I.3.1.1.3 Detectores

El detector es el sistema que se encarga de poner de manifiesto la presencia o no de analitos en una muestra. Un detector universal es aquel que responde a todos los compuestos mientras que un detector será selectivo cuando responda a menos familias de compuestos. Los detectores se pueden clasificar dependiendo de su fundamento físico en varios grupos: de conductividad térmica, ionización, electroquímicos y espectroscópicos (Dabrio, 2000). El detector debe ser calentado para evitar la condensación de los componentes eluidos de la columna.

Los detectores basados en la conductividad térmica utilizan filamentos para la detección de los analitos, dando señal cuando un analito pasa a través de él, lo que se mide en este caso es la disipación de calor cuando estos lo atraviesan, pero debido a su poca sensibilidad y selectividad están en desuso.

Los detectores iónicos se ayudan de la energía térmica, química, electromagnética o radioactiva para ionizar los analitos, la respuesta que dan este tipo de detectores se basa en su capacidad de ionizar los compuestos diana, entre estos detectores tenemos los detectores de

ionización en llama (FID), detectores termoiónicos (TID, NPD), detectores de captura de electrones (ECD) y detectores de fotoionización (PID) y espectrometría de masas (MS).

Para la detección de hidrocarburos policíclicos aromáticos mediante cromatografía de gases se ha utilizado fundamentalmente el detector tipo FID, debido a la estructura de estos compuestos estos detectores no presentan una sensibilidad suficiente como para poder arrojar datos con validez suficiente. En los últimos años el detector preferido para los investigadores es la espectrometría de masas, que en un posterior apartado se comentará.

El detector de ionización de llama (FID) es uno de los detectores más utilizados en GC, el detector consiste en una zona calentada (300-350 °C), donde llegan los analitos normalmente portados por una corriente de hidrógeno ( $H_2$ ) (Lundanes et al., 2014). En este tipo de detector la respuesta a la presencia de analitos se produce por la combustión de estos en una llama en presencia de aire y oxígeno, esta llama se encuentra bajo una diferencia de potencial de entre 100 y 300 V (Figura I.17). Al llegar los analitos a esta llama y producirse la combustión se genera una diferencia en el potencial y en la cantidad de corriente, que es registrado por el detector que hay sobre la llama, generando una respuesta en función de la composición de los analitos, a mayor número de enlaces C-H o de oxígeno la respuesta será mayor. Este detector presenta una alta estabilidad y sensibilidad, la masa mínima detectable se sitúa en torno a los 0,01-0,1 ng, con un intervalo dinámico de  $10^7$ .

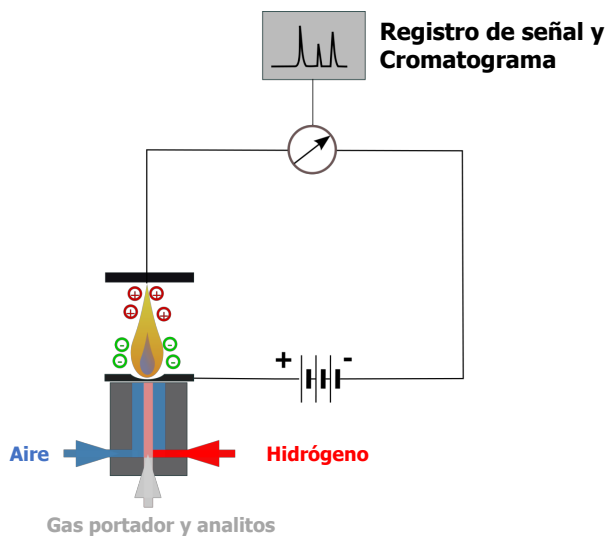


Fig. I.17. Detector tipo FID.

La aplicación de la cromatografía de gases con detector tipo FID no está muy extendida, algunos autores han utilizado esta técnica para la determinación de PAHs en muestras de aguas

residuales y té. Así, para muestras de aguas residuales se han utilizado las técnicas de extracción MAE y SPME y la GC-FID, obteniéndose unos límites de detección (LOD) entre 0,03 y 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  y una RSD que oscilaba entre 5 y 13 % (Wei et al. (2007). En el caso de las muestras de té, Singh et al. (2011) aplicaron la extracción asistida con ultrasonidos previa a la determinación por GC-MS, obteniendo unos valores de RSD de 12 %.

En la Tabla I.6 se recogen algunos de los métodos más recientes para la determinación de PAHs en muestras de agua y alimentos y están basado en el uso de la GC. En esta Tabla además se incluyen las técnicas de preparación de muestra, el detector utilizado, así como las principales características analíticas de los métodos seleccionados.

**Tabla I.6.** Métodos para la determinación de PAHs en muestras de agua y alimentos basados en la cromatografía de gases.

Muestra	Tratamiento de muestra <sup>a</sup>	Método de determinación	Características analíticas <sup>b</sup>	Referencia
<b>Aguas</b>				
Agua residual	SPE	GC-MS/MS	RSD: <28% R: 19-118% LOD: 0.002-0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$	Barco-Bonilla et al., 2011
Agua de río	SPME	GC-MS	R: 90% LOD: 0.9-3.6 $\text{ng L}^{-1}$ r: 0.990	Cheng et al., 2013
Agua de mar	LLE	HPLC GC-MS	R: 72-98.8% r2: 0.996 RSD: 0.57-1.14 % LOD: 23.4-224 $\text{ng L}^{-1}$	Delgado et al., 2004
Agua de los ríos Rhone y Sena	GPC	GC-MS HPLC GC	R: 65-90%	Fernandes et al., 1999
Agua de río, grifo y de mar	SPE	GC-MS	LOD: 2.0-8.5 $\text{ng L}^{-1}$ R: 74-122%	Ma et al., 2010
Agua de mar y de río	SPE	GC-MS	r2: 0.98 R: 88.2-102 % LODs: 0.01-0.1 $\text{ng L}^{-1}$	Montuori et al., 2012
Agua de lago	SPE	GC-MS	R: 89-113%	Qin et al., 2013
Agua de río	SPE	GC-MS	R: 79.1-120.5 % LOD: 1.6-101.8 $\text{ng L}^{-1}$	Sarria-Villa et al., 2015
Agua de río y de mar	SPE	GC-MS	R > 95% RSD: 2-8 % LOQ: 0.5-2.3 $\text{ng L}^{-1}$	Siemers et al., 2015
Agua de desecho	MAE + SPME	GC-FID GC-MS	RSD: 5-13% R: 88-103% LOD: 0.03-1 $\mu\text{g L}^{-1}$	Wei et al., 2007
Agua de bebida y río	LLE + SPE	GC-MS	RSD: 1.8-9.6 % R: 66-100%	Werres et al., 2009
Agua de río	SPE	GC-MS	R: 79-111% LOD: 0.07-1.1 $\text{ng L}^{-1}$ RSD: 5-20%	Zhang et al., 2004
Agua de lago	SPE	GC-MS	R: 89-113% r2: 0.99 LOD: 0.02-0.08 $\text{ng L}^{-1}$	Zhi et al., 2015
<b>Cereales</b>				
Grano de maíz	SLE	HPLC GC-MS	LOD: 1-6.8 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ RSD: 2.6-15.5%	De Lima et al., 2017
Arroz	QuEChERS	GC-MS	R: 60-106% LOQ: 1-5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ RSD < 20%	Escarrone et al., 2014

<b>Pan chino frito</b>	UAE	GC-MS	LOD: 0.005-0.36 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ R: 72-108%	Li et al., 2016b
<b>Arroz</b>	Soxhlet	GC-MS	R: 60-85% LOQ: 0.0009-0.0004 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ RSD: 29%	Liu et al., 2001
<b>Comidas típicas de Cataluña</b>	PLE	GC-MS	LOD: 0.3-1.5 $\text{ng g}^{-1}$ R >73% RSD < 15%	Martorell et al., 2012
<b>Cereales</b>	UAE	GC-MS/MS GC-HRMS	LOD: 0.002 - 0.006 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ R: 108-117 % (MS) 92-103% (HRMS)	Rozentale et al., 2017
<b> Bebidas </b>				
<b>Té</b>	HDSE	GC-MS	LOD: 11-26 $\text{ng L}^{-1}$	Cacho et al., 2014
<b>Té</b>	LLE+SPE	GC×GC-TOFMS	LOQ:0.05-0.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ , RSD: 2-9% R: 73-103%	Dravoba et al., 2012
<b>Té</b>	Extracción Soxhlet	GC-MS		Fiedler et al., 2002
<b>Grano de café</b>	SLE	GC	RSD: 0.9-9.3%	Grover et al., 2013
<b>Humo líquido</b>	LLE + SPE	GC-MS		Guillén et al., 2000
<b>Licores</b>	SPE	GC-MS	LOD: 0.05-0.10 $\mu\text{g L}^{-1}$ R:10%	Machado et al., 2014
<b>Café</b>	LLE + SPE	GC-MS	LOD: 0.7-6.3 $\text{ng L}^{-1}$	Orecchio et al., 2009
<b>Café</b>	Saponificación + LLE	GC-MS	RSD: 4 - 16%	Orecchio et al., 2009
<b>Té y hoja de té</b>	QuEchers	GC-MS/MS	r <sup>2</sup> : 0.99 RSD: 4-10% R: 53-82%	Pincemaille et al., 2014
<b>Hoja y corteza de pino</b>	MAE + UAE	GC-MS	R: 70-130% LOD < 0.2 $\text{ng g}^{-1}$	Ratola et al., 2009
<b>Destilados de caña de azúcar</b>	LLE + SPE	GC-MS HPLC		Riachi et al., 2014
<b>Refrescos</b>	SPME	GC-MS/MS	R: 75-113% RSD < 15% LOD: 0.1-180 $\text{ng L}^{-1}$	Robles-Molina et al., 2011
<b>Té</b>	QuEchers	GC-MS	r <sup>2</sup> : 0.99 LOQ: <0.9 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ RSD < 20%	Sadowska-Rociek et al., 2014
<b>Té</b>	UAE	GC-FID		Singh et al., 2011
<b> Carne y Pescado </b>				
<b>Alimentos ahumados</b>	Digestión alcalina + GPC	GC-MS	LOD: 0.1-1 $\text{ng Kg}^{-1}$ RSD < 20 % R > 85 %	Alomirah et al., 2011
<b>Pescado</b>	Digestión alcalina + GPC	GC-MS	LOD: 0.2-2.7 $\text{ng g}^{-1}$ R: 108 - 172 %	Bandowe et al., 2014
<b>Ternera, cerdo, pollo, cordero, salmón y marisco</b>	PLE + GPC + SPE	GC-MS	LOD: 0.1-1.1 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ RSD < 23 % R: 73 - 120 %	Duedahl-Olesen et al., 2015
<b>Carne barbacoa</b>	PLE + GPC + SPE	GC-MS	LOD: 0.1-1.3 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ RSD < 23 % R: 73 - 120 %	Duedahl-Olesen et al., 2015
<b>Pescado ahumado</b>	Soxhlet + GPC	GC-MS	LOD: 0.1-200 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ R: 72 - 102 %	Essumang et al., 2012

Pescado ahumado	MAE + MSPD	GC-MS	LOD: 0.11–0.43 ng g <sup>-1</sup> RSD: 2.8–9% R: 81.2–105.5 %	Ghasemzadeh et al., 2012
Carne a la brasa	MAE + MSPD	GC-MS	LOD: 0.15–0.3 ng g <sup>-1</sup> RSD < 9 % R: 85–100 %	Kamankesh et al., 2015
Carnes ahumadas	UAE + GPC	GC-MS	LOD: 0.05 ng mL <sup>-1</sup> R: 98–102 %	Ledesma et al., 2015
Carne, pescado, aceites y productos lácteos	ASE	GC-MS	LOD: 0.025–13 µg Kg <sup>-1</sup> R: 4.1 – 147.7 %	Martorell, 2010
Tejido graso de pescados	SLE	GC-FID	LOD: RSD %	Nwarchi et al., 2016
Mejillones y almejas	PLE + SPE	GC-MS	RSD: 8.6-17.9% LOQ: 0.2-15 pg R:62%	Pizzini et al, 2016
Coquina	Digestión alcalina + GPC	GC-MS	LOD: 4–6 µg Kg <sup>-1</sup> RSD: 5.08 % R: 20.19 %	Snyder et al., 2014
Carne ahumada, pescado ahumado	Digestión alcalina + GPC + SPE	GC-MS	LOD: 0.1–0.2 µg Kg <sup>-1</sup> R: 70 %	Wretling et al., 2010
<b>Aceites</b>				
Aceites de oliva	LLE-GPC	CC-MS/MS	RL: 0.3-200 µg kg <sup>-1</sup> RSD: 3-7.8% R:84-110%.	Ballesteros et al., 2006
Aceite de oliva	SPE	GC-MS HPLC-FLD	LOD: GC-MS:1 ng g <sup>-1</sup> HPLC-FLD: 0.5 ng g <sup>-1</sup> R > 80%	Bogusz et al., 2004
Aceite de oliva virgen extra y aceite de oliva	SPME	GC-MS	LOQ: 0.17-0.37 µg Kg <sup>-1</sup> R: 0.3-14% RL: 0.1-7.92 µg Kg <sup>-1</sup>	Purcaro et al., 2013
Aceite de oliva	HS-SPME	GC-MS	R: 74-128% RSD <10% LODs: 1 µg Kg <sup>-1</sup>	Vichi S et al., 2005
Aceite de oliva virgen extra	HS-SPME	GC-MS	RSD: 2.9-15.8 % LOD: 0.2-1.0 µg Kg <sup>-1</sup>	Vichi S et al., 2007
Aceite de oliva, cacahuete y de freidurías	LLE + SPE	GC-MS	RSD: 3.34-8.89 %	Wu y Yu., 2012
Aceites	UAE-LLE-SPE	GC-MS	LOQ: 0.02-2.6 µg Kg <sup>-1</sup> R: 98-120% RSD:0.3-13%	Yebra-Pimentel et al., 2014.
Aceite de oliva, cacahuete, soja y maíz	LLE	GC-MS/MS	R: 70-110.8% RSD: 2.1-10.2% LOD:0.1-1 µg Kg <sup>-1</sup>	Zhou et al., 2016

<sup>a</sup> MAE: extracción asistida con microondas, LLE: extracción líquido-líquido, SPE: extracción en fase sólida, SPME: microextracción en fase sólida, UAE: extracción asistida por ultrasonidos, SLE: extracción sólido-líquido, HDSE: extracción por hidroddestilación, MSPD: extracción por dispersión en fase sólida, GPC: separación por permeación de geles, PLE: extracción por líquidos presurizados.

<sup>b</sup> LOD: límite de detección, LOQ: límite de cuantificación, r: coeficiente de correlación, RSD: desviación estándar relativa, R: recuperación; RL: intervalo lineal.

### I.3.1.2 Cromatografía líquida de alta eficacia

La cromatografía líquida de alta eficacia comprende todas las técnicas cromatográficas en las que la fase móvil es un líquido y la fase estacionaria se encuentra en una columna (Dabrio, 2000). La fase móvil es un disolvente que contiene a la muestra en una forma de mezcla de solutos. La interacción fase móvil-soluto tiene una alta importancia en la cromatografía de líquidos, la gran facilidad para cambiar la naturaleza de la fase móvil hace que esta técnica sea muy versátil y aumenta la selectividad al poder utilizar soluciones que se adecúen a los analitos en cuestión.

La clasificación de los diferentes tipos de HPLC se realiza en función de del mecanismo de separación que se aplique, a la naturaleza de su fase estacionaria (Skoog et al., 2017), éstas son en fase inversa, intercambio iónico, pares iónicos y exclusión molecular dependiendo de la interacción fisicoquímica que se dé lugar entre analitos y fase estacionaria.

#### I.3.1.2.1 Fase inversa

Los materiales de fase reversa reciben este nombre debido a que la elución se produce en orden aproximadamente inverso a si realizáramos una cromatografía de adsorción con materiales polares. Esto significa que los analitos no polares están más retenidos que los analitos polares dentro de una fase estacionaria no polar. Los empaquetamientos en fase reversa suelen utilizar fases móviles acuosas tamponadas (con una pequeña parte de disolvente orgánico miscible), pero se pueden utilizar fases móviles orgánicas para determinadas moléculas hidrofóbicas como son los lípidos. Normalmente estas mezclas suelen ser acetonitrilo-agua o metanol-agua con un buffer para el control del pH (Lundanes et al., 2014). Este tipo de fase es de las más usadas en la actualidad ya que presentan una gran estabilidad, son reproducibles y de pequeño tamaño de partícula, lo cual permite una alta velocidad de transferencia de materia. Las más comunes son las basadas en sílice con funcionalidad alquilo, C8 y C18, aunque también se dispone de fases poliméricas y oligoméricas.

#### I.3.1.2.2 Intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico se basa en el intercambio reversible de especies cargadas entre una disolución y un sólido. Existen una serie de grupos ionizables permanentes en la superficie de la fase estacionaria, en ausencia de solutos estos grupos se bloquean por un contraión que estará presente en la fase móvil a una concentración constante. Este contraión es el que participa en el intercambio iónico con los analitos cuando estos aparecen. En función de si la ionización es permanente o se puede modificar tenemos los intercambiadores fuertes o débiles, los primeros no verán modificada su capacidad intercambiadora a pesar de que el pH sufra

modificaciones, mientras que los segundos pierden o ganan capacidad de intercambio conforme el pH se modifica.

La mayor o menor selectividad que proporcionan las columnas en este tipo de técnica cromatográfica depende de la concentración de iones presente en la fase móvil y del pH que se haya ajustado mediante la adición de un tampón, la variación en la fase móvil de los iones hace que aumente o disminuya la retención de los analitos en la fase estacionaria. La modificación del pH ayuda a una mayor o menor ionización de los analitos en la muestra, por tanto, afectará directamente a la mayor o menor retención. Las fases estacionarias para este tipo de cromatografía se dividen en intercambiadores aniónicos y catiónicos, a su vez estos se subdividen en débiles o fuertes en función del tipo de ionización que provean, como se ha mencionado anteriormente. Los intercambiadores catiónicos fuertes suelen estar formados por grupos sulfónicos y los débiles por grupos carboxilatos. En el caso de los intercambiadores aniónicos fuertes tenemos sales de amonio cuaternarias y, para los intercambiadores aniónicos débiles, aminas primarias.

#### I.3.1.2.3 Pares iónicos

Este tipo de separación cromatográfica se lleva a cabo en columnas de fase reversa, la fase móvil se presenta como un tampón acuoso con un modificador que contiene un contraión de carga opuesta a los analitos. La naturaleza y la concentración de este contraión, la fuerza iónica de la fase móvil y el pH van a determinar los parámetros de retención de los analitos sobre el material de empaquetamiento de la columna.

La formación del par iónico se ve influenciada por todos los factores anteriores, y estos influirán más o menos en función de si se produce en la fase móvil o en la estacionaria. Cuando el par iónico se produce en la fase móvil la retención pasa a depender de la superficie iónica del contraión y de la carga del soluto, pero no de su tamaño (Cela et al., 2003). La sal añadida hace que aumente la fuerza iónica y por consecuencia la competencia entre el analito y la sal por unirse a los contraiones, aumentando la tensión superficial por aumento de concentración de sales. El pH es otro valor para tener en cuenta, a mayor ionización por efecto de pH mayor formación de pares iónicos y mayor retención en la fase estacionaria.

#### I.3.1.2.4 Exclusión molecular

La cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) se basa en la separación de macromoléculas en materiales porosos con un determinado tamaño de poro (Lundanes et al., 2014). La fase móvil en este tipo de cromatografía suele ser acuosa y los analitos son normalmente proteínas. Cuando tenemos una fase móvil con naturaleza orgánica y fases estacionarias poliméricas

hablamos de cromatografía de permeación en gel (GPC), la cual se ha tratado anteriormente en este trabajo.

Actualmente los materiales más utilizados para la SEC son materiales basados en sílice o poliestirenos con una gran variedad de tamaño de poro, desde los 6 hasta los 100 nm, la elección de un poro adecuado proporcionará una mejor o peor separación cromatográfica. Hay que tener en cuenta también la geometría de las moléculas a separar. En este caso no se realiza una separación selectiva de analitos respecto a la matriz que los porta, sino que se realiza una separación en fracciones en función del tamaño de la molécula.

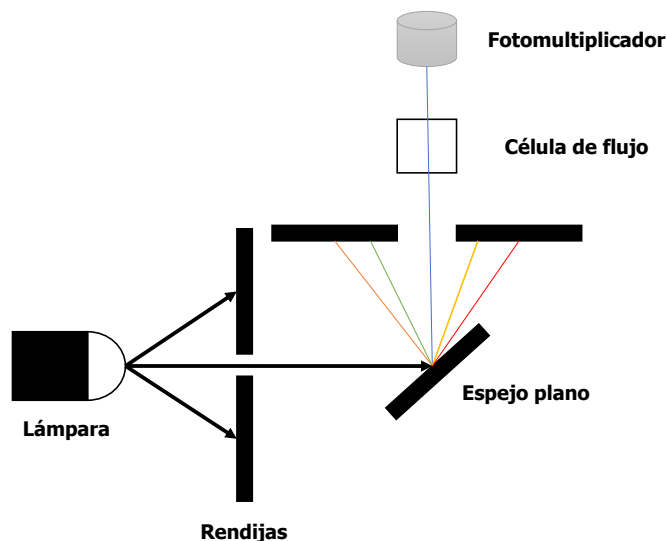
#### I.3.1.2.5 Detectores

En la técnica de HPLC tradicionalmente se han utilizado dos tipos de detector, de fluorescencia (FLD) y el detector de absorbancia ultravioleta-visible (UV-Vis). La elección entre uno u otro va a depender de variables que afectan a la respuesta de los analitos: ruido, deriva, zona lineal, selectividad, sensibilidad, etc. Además de tener en cuenta la naturaleza de los analitos y las necesidades que se tengan. Actualmente, se está utilizando con mucha frecuencia el detector de espectrometría de masas acoplado al cromatógrafo de líquidos. Este tipo de detector se tratará en un apartado posterior.



Detector ultravioleta-visible

En los detectores UV-Vis un haz de luz producido por una lámpara se hace pasar por una serie de rendijas, este haz de luz es a su vez separado en haces de varias longitudes de onda diferentes en un monocromador, estos haces son filtrados y seleccionados, sólo las longitudes de onda elegidas se harán incidir sobre la muestra. Tras llegar a la muestra se produce una señal que recibirá la célula del detector (Figura I.18).



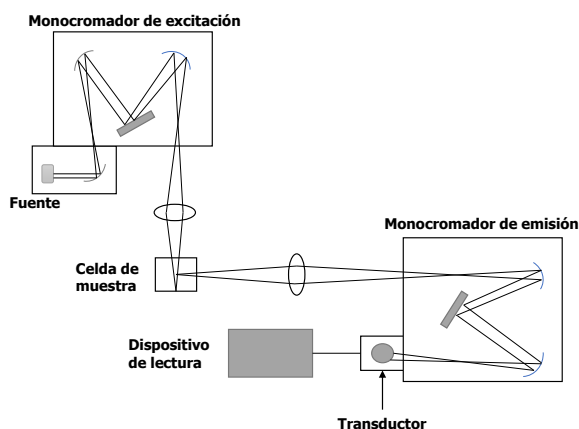
**Fig. I.18.** Esquema de un detector UV-Vis de un simple haz.

Actualmente se utilizan lámparas que nos ofrecen un intervalo de longitudes de onda más amplio, lo cual posibilita a través del uso de filtros la elección de una o varias longitudes de onda para la detección de los analitos, seleccionando la zona con mayor absorbancia para uno o varios analitos, lo cual mejora la selectividad y los límites de detección de este tipo de detectores.

Una variante de la detección UV-Vis es el uso del detector con diodos en fila (DAD), esta detección se lleva a cabo con una lámpara policromática (luz blanca). Este haz se hace pasar por la muestra y se rompe en varias longitudes de onda, la cual es medida en el plano focal por una matriz de cientos de fotodiodos, lo cual proporciona una gran cantidad de información (Lundanes et al., 2014). Este detector nos va a dar información sobre el tiempo, la absorbancia y la longitud de onda, la resolución va a depender de la cantidad de diodos y de longitudes de onda detectadas.

~ Detector de fluorescencia

Este método de detección se basa en la capacidad de algunos compuestos en excitarse a determinadas longitudes de onda y emitir una radiación de una mayor longitud de onda que la que previamente ha absorbido. Esta radiación es normalmente medida de manera perpendicular al haz de luz de excitación, gracias a la elección de la longitud de onda se pueden seleccionar las moléculas o grupos funcionales de estas que queremos que se exciten y emitan radiación. Este tipo de detector presenta una fuente y una serie de filtros los cuales nos ayudarán a seleccionar si queremos obtener los espectros de emisión o absorción de los analitos en cuestión (Figura I.19).



**Fig. I.19.** Esquema de un detector de fluorescencia para HPLC.

Este detector es uno de los más utilizados en HPLC tanto para compuestos que presentan fluorescencia de manera natural como aquellos que mediante el proceso de derivatización se convierten en compuestos fluorescentes. Este tipo de detector presenta más sensibilidad que el detector UV-Vis en un menor intervalo lineal, pero es más específico, al poder detectar especies con una fluorescencia específica en muestras que contienen una alta cantidad de compuestos en ella.

En la Tabla I.7 se recogen algunos métodos relevantes para la determinación de PAHs en muestras de agua alimentos basados en el uso de la cromatografía líquida de alta eficacia con diferentes detectores.

**Tabla I.7.** Métodos para la determinación de PAHs en muestras de agua y alimentos basados en el uso de la cromatografía líquida de alta eficacia.

Muestra	Tratamiento de muestra <sup>a</sup>	Método de determinación	Características analíticas <sup>b</sup>	Referencia
<b>Aguas</b>				
Agua de mar	LLE	HPLC-FLD GC-MS	R: 72-98.8% r2: 0.996 RSD: 9.2 % LOD: 23.4-224 ng L <sup>-1</sup>	Delgado et al., 2004
Agua de río	GPC	GC-MS HPLC GC	R: 65-90%	Fernandes et al., 1999
Agua de río y potable	DDLME	HPLC-MS/MS	R: 95.1-98.5% RSD: 1.4-8.7 % LOD: 8.9-89 ng L <sup>-1</sup>	Guiñez et al., 2018
<b>Cereales</b>				
Grano de maíz	SLE	HPLC GC-MS	LOD: 1-6.8 µg Kg <sup>-1</sup> RSD: 2.6- 15.5%	De Lima et al., 2017
Gofio, cereal tostado	UAE	HPLC-UV HPLC-FLD	R: 70.1 -109% RSD: < 12.6% LOD: 0.02-4.01 µg L <sup>-1</sup>	Germán- Hernández et al., 2011
Café instantáneo	SLE	HPLC-FLD	R: 87% RSD ≤ 8% LOD: 0.01 - 0.05 µg Kg <sup>-1</sup>	García-Falcón et al., 2005
Pan y pan tostado	SLE	HPLC-FLD	R: 82-103% RSD: 8% LOD: 0.08-1.3 µg L <sup>-1</sup>	Rey-Salgueiro et al., 2008
<b>Bebidas</b>				
Suplementos dietéticos a base de propóleo	MAE	HPLC		Moret et al., 2010
Café torrefacto	LLE + SPE	HPLC-FLD	RSD: 9-30% R: 77-87%	Tfouni et al., 2013
Té	SLE + SPE	HPLC		Londoño et al., 2015
Infusiones	LLE + SPE	HPLC-FLD	LOD: 1.2-25 ng L <sup>-1</sup> LOQ: 4.0-65.6 ng L <sup>-1</sup> RSD: 3.14-5.52 %	Thea et al., 2016
Té	UAE + SPE	HPLC	R: 71.6 - 103% RSD: <20%	Lin et al., 2015
Zumo de azúcar	LLE	HPLC-FLD	LOD: 0.014- 0.48 µg Kg <sup>-1</sup> R: 52-84 % CV: 6-18 %	Silva et al., 2011
Zumo de azúcar	SLE	HPLC-FLD	LOD: 0.004- 0.009 µg Kg <sup>-1</sup> R: 90.8-105.2 % CV: 6.7-15.2 %	Tfouni et al., 2009
Bebidas alcohólicas	SLE + SPE	HPLC-FLD	R: 8-102% RSD: 8-11% LOD: 0.1-2.0 ng l <sup>-1</sup>	García Falcón y Simal-Gándara., 2005.

Té	SBSE + LLE	HPLC-FLD	r <sup>2</sup> : 0.996 LOD: 0.1-8.9 ng L <sup>-1</sup> LOQ: 0.3-29.7 ng L <sup>-1</sup> R: 24.2-87%	Gomes et al., 2005
Té	SPE	HPLC-FLD	RSD: 0.1-1.8% LOD: 0.016- 0.14 ng mL <sup>-1</sup> R >65%	Kayali et al., 1998.
Café y té	LLE + SPE	HPLC- UV/VIS	RSD: 0.4-7% R > 68%	Bishnoi et al., 2005
Destilados (ron, cachaca, alcohol combustible)	SPE	HPLC-FLD		Galinaro et al., 2009
Té	SPME + UAE	HPLC-FLD	LOD: 0.1-50 ng L <sup>-1</sup> R: 91.1-107.2 %	Loh et al., 2013
Vino, vinagre, destilados	SLE	HPLC- UV/VIS	LOD: 0.02-0.80 ng g <sup>-1</sup>	Chinnici et al., 2007
Té	SBSE	HPLC-FLD	LOD: 0.1-8.9 ng L <sup>-1</sup> RSD: < 10.1 % R: 24.2-87.0%	Zuin et al., 2005
<b>Carne y Pescado</b>				
Mejillones y anguila	Soxhlet + SPE	HPLC-FLD	LOD: 0.01- 0.49 ng mL <sup>-1</sup> RSD < 15 % R: 85 - 114 %	Barhoumi et al., 2016
Pollo, ternera y pescado.	SPE	HPLC-FD	LOD: 0.01- 0.03 ng g <sup>-1</sup> RSD: 15.9 - 21.3 % R: 68.3 - 118 %	Fahradian et al., 2010
Pollo, salchichas, pescado, ternera	Digestión alcalina + SPE	HPLC-FLD		Jahurul et al., 2013
Pollo, cerdo y pescado	Digestión alcalina + SLE + SPE	HPLC-FLD	LOD: 0.06- 0.08 µg Kg <sup>-1</sup> R: 55.9 - 57.9 %	Lu et al., 2017
Pescado	MAE	HPLC- UV/VIS	LOD: 0.1-0.5 ng g <sup>-1</sup> RSD: 0.9-4.9 % R: 86-98 %	Pena et al., 2006
Carne ahumada, salchicha italiana	MAE + GPC	HPLC	LOQ: 0.1-0.6 µg Kg <sup>-1</sup> RSD < 13 % R: 77 - 103 %	Purcaro et al., 2009
Leche, productos para bebés de carne y pescado	Digestión alcalina + SLE	HPLC-FLD	LOD: 0.005- 0.11 µg Kg <sup>-1</sup> R: 65.2-89.3 %	Santonicola et al, 2017
Carne de bovino, ternera, salmón.	Digestión alcalina + SPE	HPLC-FLD	LOD: 0.07- 0.47 ng mL <sup>-1</sup> RSD1: 3.79- 8.17 % R: 15.4 - 145 %	Viegas et al., 2012
Carne a la parrilla	Digestión alcalina + LLE + SPE	HPLC-MS	DL: 1.0 ng mL <sup>-1</sup>	Ince y Yaman, 2012
Pescado y carne	Digestión alcalina + SLE	HPLC-FLD	LOD: 0.18 µg Kg <sup>-1</sup> RSD: 0.6-0.9 % R: 83 - 101 %	Zachara et al, 2017

Pescado	ASE + GPC	HPLC-DAD-FLD	LOD: 0.07–3.52 ng g <sup>-1</sup> RSD < 12 %	Zhao et al., 2014
<b>Aceites</b>				
Aceite de oliva y girasol	MAE + LLE + SPE	HPLC-FLD	LOD: 0.8-7 µg Kg <sup>-1</sup> r: 0.9953-0.9977 RSD: 2-9% R: 62-88%	Alarcon et al., 2012
Aceite de oliva	SPE	GC-MS HPLC-FLD	LOD: GC-MS: 1 ng g <sup>-1</sup> HPLC-FLD: 0.5 ng g <sup>-1</sup> R > 80%	Bogusz et al., 2004
Aceite de soja	LLE + SPE	HPLC-FLD	R: 71-115% LOD: 0.02-0.76 µg Kg <sup>-1</sup> RSD: 1.1-11.9%	Camargo et al., 2011
Aceite de oliva, maíz y girasol. Carne barbacoa	Digestión alcalina + LLE	HPLC UV-VIS	R: 75-127% RSD: 0.16 – 1.60 % LOD: 0.26-1.15 µg L <sup>-1</sup>	Dost K et al, 2012
Aceite de oliva virgen y aceitunas	SPE	HPLC	RSD < 13%	Gharbi et al., 2017
Aceite de oliva		HPLC-DA-APPI-MS/MS HPLC-FLD	RSD < 5% LOD: 0.16-0.36 µg Kg <sup>-1</sup>	Hollosi L et al., 2011.
Aceites vegetales comestibles	SPE	HPLC-FLD	R: 78.8-102.7 % RSD: 1.3-9.3% LOD 0.06-0.2 µg Kg <sup>-1</sup>	Luo et al., 2007
Aceite de soja	LLE + SPE	HPLC-FLD	LOD: 0.11-1.01 µg Kg <sup>-1</sup> R: 70-120% RSD: 10%	Rojo Camargo et al., 2012
Aceites vegetales comestibles	LLE	HPLC-AP-MS/MS		Shi et al., 2016
Aceite de oliva virgen, girasol y soja	LLE + SPE	HPLC-FLD	LOD: 4-92 ng Kg <sup>-1</sup> RSD: 1.09-4.23% R: 29-65%	Teixeira et al., 2007
Aceites	SFE	HPLC-FLD	RSD: 2.7-4.5% LOD: 12-16 ng g <sup>-1</sup>	Zougagh et al, 2014

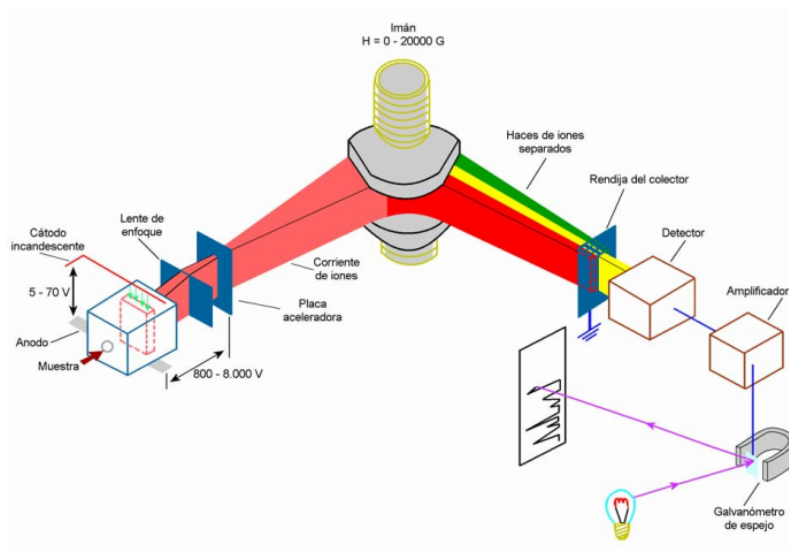
<sup>a</sup> MAE: extracción asistida con microondas, LLE: extracción líquido-líquido, SPE: extracción en fase sólida, SPME: microextracción en fase sólida, UAE: extracción asistida por ultrasonidos, SLE: extracción sólido-líquido, DDMLE: microextracción dispersiva líquido-líquido, SBSE: extracción sobre barra magnética agitadora, GPC: separación por permeación de geles, ASE: extracción acelerada por disolventes, SFE: extracción con fluidos supercríticos.

<sup>b</sup> LOD: límite de detección, LOQ: límite de cuantificación, r: coeficiente de correlación, RSD: desviación estándar relativa, R: recuperación; RL: intervalo lineal.

### I.3.2 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas, uno de los sistemas de detección más importantes en cromatografía, se basa en obtener iones a partir de moléculas orgánicas en estado gaseoso, estos iones son separados en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ). La espectrometría de masas nos da información estructural, lo cual es útil para realizar una identificación de compuestos además de su cuantificación.

Como se puede observar en la Figura I.20, un espectrómetro de masas se compone de una fuente de ionización, un analizador y un detector de iones (Lundanes et al., 2014).



**Fig. I.20.** Esquema de un espectrómetro de masas.

#### I.3.2.1 Introducción de muestra

En el espectrómetro de masas se introduce una pequeña cantidad de muestra, normalmente el sistema contiene un medio que permite que esta muestra, sólida o líquida, sea volatilizada. La muestra puede ser introducida de manera indirecta, directa o mediante un acoplamiento a un cromatógrafo de gases o líquidos. El acoplamiento a un cromatógrafo es el tipo más utilizado actualmente. En esta Memoria se utilizará el acoplamiento de la cromatografía de gases-espectrometría de masas.

### I.3.2.2 Fuente de ionización

La ionización de la muestra puede llevarse a cabo mediante dos métodos, impacto electrónico e ionización química. De ellos el más aplicado actualmente es la ionización mediante impacto electrónico (EI). Los electrones son formados en un filamento y lanzados como un haz de electrones de entre 5 y 70 eV a través de la cámara de ionización. Los analitos que están en la cámara en forma gaseosa y a baja presión son ionizados por este haz de electrones y se forman iones moleculares positivos. Estos iones son acelerados y mantienen una trayectoria determinada gracias a la acción de campos magnéticos paralelos a la dirección de los electrones. Durante este proceso las moléculas pueden perder un electrón o dos, captar un electrón o disociarse por efecto del haz de electrones, la energía que se les suministra es superior siempre a su potencial de ionización, por lo tanto, se generan iones moleculares activados que van a tener una energía mayor que la que tendrían en un estado fundamental. La estabilidad de los iones que se generan es el principal problema de este método de ionización, en algunos casos el ion no se descompone mientras que en otras ocasiones no va a quedar ion molecular, siendo imposible la determinación del analito.

Por otro lado, la ionización química (CI) se suele utilizar cuando lo que se busca en la información sobre la masa molecular de los compuestos, ya que ofrece menos fragmentación al ser una técnica de ionización más suave. En CI, las moléculas son ionizadas mediante reacciones de ion/neutro entre las moléculas y los iones que se forman en el gas reactivo, dando normalmente como resultado moléculas protonadas,  $MH^+$  (Lundanes et al., 2014). El gas reactivo suele ser metano, que es introducido a una presión de 1 mmHg, generando el ion metonio que finalmente interactuará con los analitos.

### I.3.2.3 Analizador de iones

Una vez ionizada, la muestra se compone de una multitud de iones que se deben separar correctamente para poder determinar las diferentes especies, los analizadores de iones más utilizados son el de sector magnético (B), analizador cuadrupolar (Q), analizador de trampa de iones (TQ) y el analizador de tiempo de vuelo (TOF).



#### Analizador de sector magnético

Este tipo de analizador aplica un campo magnético perpendicular a la trayectoria que llevan los electrones que salen de la cámara de ionización, los iones salen con una velocidad elevada y al aplicar el campo magnético se les obliga a realizar una trayectoria circular.

Dependiendo de la relación  $m/z$  de cada especie esta describirá una trayectoria de un radio determinado, esto les permitirá pasar por la rendija de salida y ser detectados en el caso de las especies que deseamos obtener y los iones que no interesan describirán una circunferencia de un radio que no permite pasar por la rendija y, por tanto, no serán determinados.

Estos espectrómetros se hacen trabajar a máximo potencial de aceleración para que la sensibilidad mejore junto al poder de resolución. Si lo que se busca es realizar barridos rápidos o frecuentes no es el analizador idóneo ya que la variación del campo magnético no va a ser correlativa a la variación de la corriente en el electroimán.

#### Analizador cuadrupolar

Este analizador cuadrupolar (Q) posee cuatro barras de metal de sección circular o hiperbólica dispuestas en forma de circunferencia, los iones que se envían al analizador desde la cámara de ionización van directos al centro de esta circunferencia imaginaria (Figura I.21). Este tipo de analizador no aplica campos magnéticos para dispersión, por lo que se puede utilizar para realizar barridos con rapidez. En las barras, de manera alterna, se aplica una diferencia de potencial constante y un potencial alterno de radiofrecuencia. Mientras que estos campos no afectan al movimiento longitudinal de manera independiente, la combinación de ellos hace que se produzca un movimiento lateral.

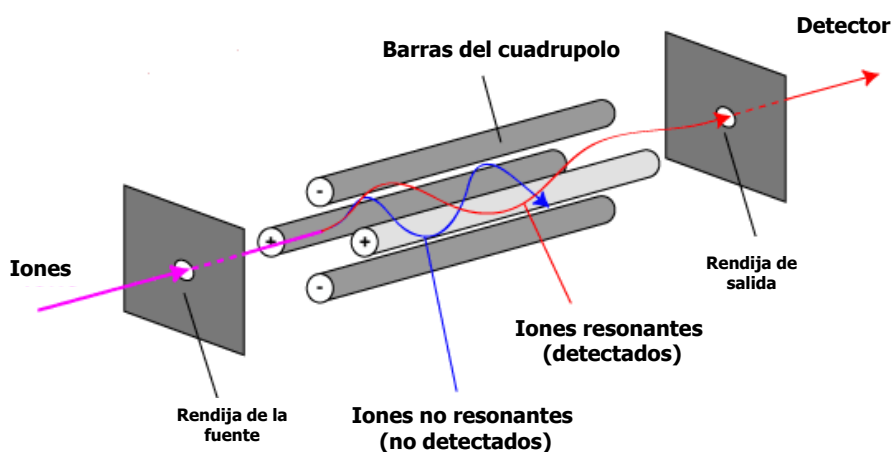
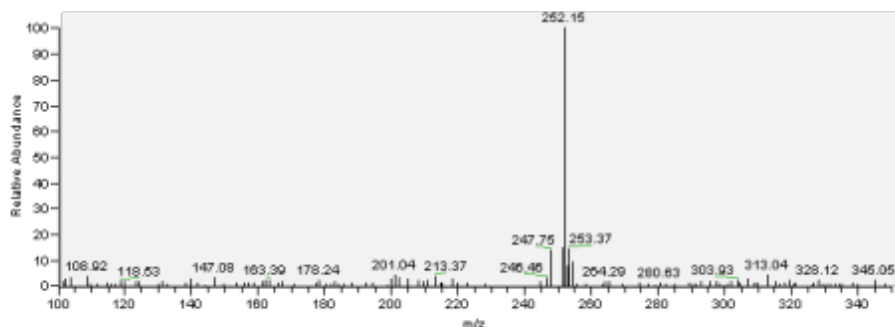


Fig. I.21. Analizador cuadrupolar (Dayana, 2008).

El movimiento de los iones a través de las barras se ve marcado por la relación masa/carga ( $m/z$ ), el desplazamiento del ion será estable a través de estas barras sólo en un pequeño intervalo

de frecuencia, el resto de iones chocarán contra las barras, siendo el cuadrupolo el que determina qué relación  $m/z$  pasa a través de él.

Este tipo de analizador tiene una alta sensibilidad, se trabaja sólo aplicando campos eléctricos y no hace falta el uso de rendijas para el haz, siendo la escala de masas lineal frente al potencial que se utiliza. La desventaja que presenta es que este analizador no permite trabajar con relaciones masa/carga mayor de 1000. En la Figura I.22 se muestra el espectro de masas correspondiente al benzo(a)pireno.



**Fig. I.22.** Espectro de masas del benzo(a)pireno



Analizador de trampa de iones

Este analizador es el resultado de una modificación del analizador cuadrupolar, este analizador utiliza los campos eléctricos que oscilan para que los iones se queden atrapados en un espacio tridimensional entre tres electrodos, uno con forma de anillo y dos con forma de hipérbola. Entre los tres electrodos se produce la ionización, la fragmentación y el análisis de masas (Figura I.23). En los electrodos se aplican diferentes potenciales de radiofrecuencia, dependiendo de si es el electrodo con forma de anillo o los dos hiperbólicos. El campo electromagnético resultante es el que atrapa a los iones en una trayectoria oscilante en función tanto de la relación masa/carga y del voltaje que se les aplique.

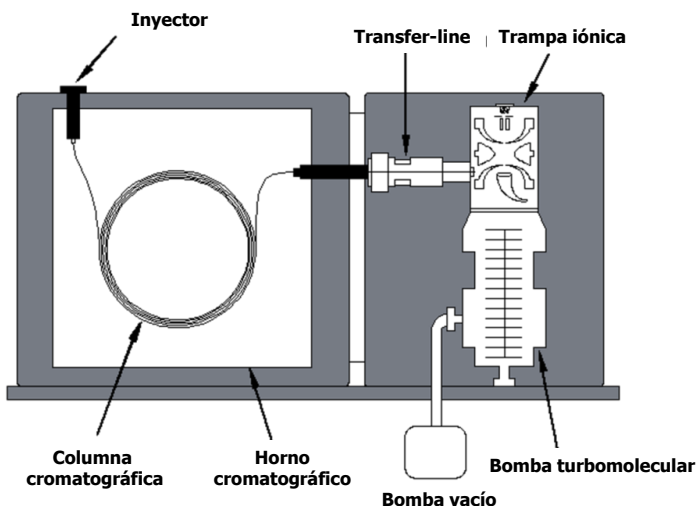


Fig. I.23. Cromatografía de gases con analizador de trampa de iones

Para la detección lo que se aplica es una modificación del potencial de un electrodo, lo cual provoca una modificación en la trayectoria de los iones de interés, estos saldrán de la cámara directamente hacia el detector. Aunque es un analizador que presenta una gran sensibilidad el peligro de tener reacciones entre los iones que se quedan confinados en la cámara le resta capacidad en los análisis cuantitativos.



#### Analizador de tiempo de vuelo

El analizador de tiempo de vuelo se basa en la separación de iones por el tiempo que tardan en recorrer un espacio libre campo. En TOF los iones se aceleran aplicándoles a todos una diferencia de potencial, al ser esta diferencia de potencial igual para todos, la velocidad que alcancen va a depender de la relación  $m/z$  que posea cada uno.

Los detectores asociados a TOF deben ser siempre rápidos, los iones alcanzan grandes velocidades y si el detector no es lo suficientemente rápido para detectar estos iones la detección no será fiable ni precisa.

La muestra es vaporizada a la entrada del detector y es ionizada por un pulso de electrones, tras aplicar la diferencia de potencial, los iones son lanzados a través de una zona libre de campo en la que se desplazarán a velocidad constante hasta llegar al detector que se sitúa al final de esta cámara.

Este analizador permite realizar análisis de manera rápida y no hay prácticamente limitación a la hora de introducir especies con alta masa, en el caso de usarlo junto a la cromatografía de gases esta va a ser la que ponga el límite a la masa de los compuestos a analizar.

La desventaja que plantea este analizador es la poca distancia que hay entre el electrodo de aceleración y el detector, si se desea aumentar la resolución se debe recurrir al uso de reflectrones.

#### I.3.2.4 Detectores

Los detectores son los encargados de recibir los iones que salen del analizador, estos iones al llegar estarán con una baja intensidad, lo cual puede provocar problemas a la hora de ser detectados, por ello, los detectores deben ser precisos y rápidos.

En la actualidad se utilizan tres tipos de detectores: la copa de Faraday y el fotomultiplicador de electrones.



#### Copa de Faraday

Es el detector más simple, la copa de Faraday es un electrodo donde los iones depositan su carga (Gross, 2017). La corriente eléctrica que fluye desde el electrodo da como resultado un voltaje que pasa por una resistencia de alta impedancia.

Esta copa es una placa situada dentro de una caja, emplazada de manera ligeramente inclinada para que los iones no reflejen. La corriente que mide y amplifica será proporcional al número de iones que llegan a la placa y de la neutralización de las cargas sin tener en cuenta su masa o naturaleza. Es un método de detección barato, resistente y con alta precisión y sensibilidad, pero es poco recomendable para determinaciones rápidas.



#### Fotomultiplicador de electrones

El fotomultiplicador de electrones consiste en una serie de placas cuya superficie está recubierta de tierras raras, los iones al chocar con estas placas se producen una serie de electrones que irán dirigidas hacia una serie de placas de hasta de 16 elementos. Cuando una partícula energética incide sobre la superficie de un metal o un semiconductor se liberan una serie de electrones secundarios. La alta velocidad de la partícula de impacto, junto a la existencia de electrones libres en la superficie del metal hace que se liberen muchos más electrones, estos electrones son lanzados contra otra placa puesta de manera opuesta, lo cual genera una cascada amplificada hasta llegar a la última placa (Gross, 2017).

Con esta serie de placas dispuestas de manera que se amplifique la corriente se consigue amplificar el potencial de cada uno hasta los 100 V, generando una corriente de energía que es capaz de ser detectada con mayor facilidad, llegando a tener un factor de multiplicación de entre  $10^6$ - $10^8$ . Estos detectores son ampliamente usados en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas por su robustez y precio, aunque a veces pierdan algo de sensibilidad.

### I.3.3 Acoplamiento de técnicas cromatográficas con la espectrometría de masas

#### I.3.3.1 Cromatografía de gases – espectrometría de masas

Debido a la complejidad que confiere la tarea de determinar moléculas que forman parte de una mezcla y que normalmente vamos a encontrar a bajas concentraciones se ha recurrido a la combinación de técnicas cromatográficas junto a la espectrometría de masas (GC-MS). La ventaja que se obtiene al acoplar estos dos equipos es la de poder obtener más información sobre los compuestos separados mediante cromatografía de gases, el espectrómetro de masas nos proporciona la identidad de los compuestos que llegan hasta él. Otra ventaja que presenta este tipo de acoplamientos radica en su capacidad para trabajar con pequeñas cantidades de muestra que será previamente separada y eluida por un cromatógrafo de gases y además poseen la capacidad de determinar estos compuestos conforme van siendo eluidos de esta columna cromatográfica (Mondello, 2011).

Este acoplamiento de equipos nos permite además trabajar de manera en la que podemos seleccionar las relaciones masa/carga que nos interesan determinar y cuantificar en lugar de obtener un espectro de todos los compuestos que eluyen de la columna como tendríamos si se realizara una GC tradicional. Gracias al registro selectivo de iones (SIM) podemos realizar esta operación, aumentando la selectividad y la sensibilidad al disminuir el ruido de fondo de la muestra.

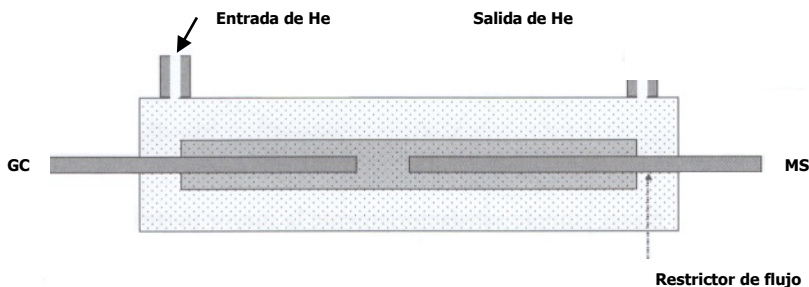
Para el acoplamiento de estas dos técnicas analíticas se debe tener en cuenta que los compuestos orgánicos se encuentran en fase gaseosa. La espectrometría de masas cumple con los requisitos necesarios para el acople con la cromatografía de gases (Dabrio, 2000), aunque presenta el problema de trabajar a vacío, lo cual puede presentar problemas el elevado volumen de gas portador que procede del cromatógrafo.

El sistema de vacío en el espectrómetro de masas es necesario para evitar que la cámara de ionización se contamine o se oxide el filamento y los componentes de alrededor a altas temperaturas. La cantidad de gas portador es importante tenerla en cuenta ya que podría competir

con la muestra en el proceso de ionización y produciría fenómenos de ionización química, reduciéndose además la resolución (Dabrio, 2000).

Existen diferentes posibilidades de acoplamientos dependiendo del diámetro de la columna cromatográfica que se emplee. Para columnas capilares, en las cuales el flujo no suele ser superior a  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , los sistemas de bombeo del espectrómetro de masas son capaces de eliminar el gas sin necesidad de realizar ningún tipo de ajuste. La columna debe estar termostatazada a la temperatura y se introduce hasta la cámara de ionización sin ningún tipo de requisito instrumental (Dabrio, 2000). Teniendo en cuenta el cambio de presión, lo cual produce dilución de las zonas cromatográficas.

La conexión entre la columna y el espectrómetro de masas se lleva a cabo mediante la división en régimen abierto, la sencillez y versatilidad de este sistema hace que casi de manera exclusiva se utilice este acoplamiento en la GC-MS, como se puede observar en la Figura I.24, siendo el único inconveniente que pasado un tiempo la columna cromatográfica sufrirá un sangrado del relleno y tendrá que ser cambiada (Kellner et al., 2004).



**Fig. I.24.** Cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas

Gracias a esta gran selectividad y sensibilidad la GC-MS se ha erigido como uno de los principales métodos de detección y cuantificación de mezclas de compuestos, entre ellos los hidrocarburos policíclicos aromáticos.

Un número elevado de autores han utilizado la GC-MS para la determinación de PAHs en diferentes matrices, como agua como se puede observar en la Tabla I.6. Con este tipo de hibridación se pueden obtener una sensibilidad muy elevada en la determinación de PAHs en este tipo de matrices. Por ejemplo, para el análisis de aguas se obtienen unos límites de detección entre  $0.07$  y  $1.1 \text{ ng L}^{-1}$  (Zhang et al., 2004); o bien cuando se aplica al análisis de cereales ( $0.005$ - $0.36 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) (Li et al., 2016a) o en bebidas como el café ( $0.1$ - $6.3 \text{ ng L}^{-1}$ ) (Orecchio et al., 2009).

### I.3.3.2 Cromatografía líquida de alta eficacia – espectrometría de masas

El acoplamiento de la cromatografía líquida de alta eficacia junto a la espectrometría de masas (HPLC-MS) está siendo cada vez más común. Lo que hace a este acoplamiento en cierta manera dificultoso es la interfase que se aplica entre los dos instrumentos, debido a que en HPLC se trabaja con líquidos a alta presión, con un alto flujo de fase móvil y a temperatura ambiente, mientras que en MS se trabaja a vacío y a una alta temperatura. Por lo tanto, es imprescindible modificar algunos parámetros, como son que en la fase móvil no puede haber presencia de analitos no volátiles o inorgánicos, otras cosas para tener en cuenta es que la cromatografía líquida puede analizar moléculas pesadas con una baja volatilidad y alta polaridad y que pueden ser degradadas por acción térmica, lo cual ocurriría al entrar en el espectrómetro de masas. Otro factor por controlar es el flujo de la fase móvil, gracias a la interfase vamos a poder introducir un eluido líquido transformándolo en una muestra gaseosa en el espectrómetro de masas, pero teniendo en cuenta que este caudal una vez convertido en vapor va a aumentar.

Las interfases más usadas en HPLC-MS son la ionización por electrospray (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI), fotoionización a presión atmosférica (APPI) e ionización por plasma de acoplamiento inductivo (ICP) (Lundanes et al., 2014).



#### Ionización por electrospray

La ionización por electrospray (ESI) se lleva a cabo a presión atmosférica y se usa principalmente para compuestos con grupos polares (neutros, ácidos y bases). Los compuestos polares neutros aceptan y donan protones bajo determinadas condiciones, generando iones positivos o negativos en la fase móvil o durante el ESI, para ácidos y bases el pH se debe ajustar.

En ESI, la fase móvil que contiene a los analitos se introduce en un capilar en el cual se está aplicando una diferencia de potencial, a la salida del capilar se mezcla con un gas nebulizador ( $N_2$ ) para la formación de pequeñas gotas, estas gotas salen altamente cargadas por la acumulación de iones. Estas gotas cargadas van disminuyendo su tamaño conforme se acercan a la entrada del espectrómetro de masas, cuando las fuerzas externas son mayores que la tensión superficial estas gotas estallan en otras gotas más pequeñas.

Esta interfase provee una gran sensibilidad y no se necesita una gran optimización para que funcione de manera correcta, siendo útil para compuestos de alto peso molecular. Se aplica a bajos niveles de caudal ( $<50 \mu L \text{ min}^{-1}$ ), conforme disminuye el caudal aumenta el nivel de ionización (Lundanes et al., 2014).



### Ionización química a presión atmosférica

La ionización química a presión atmosférica (APCI) se usa en caso de tener menos compuestos polares, igualmente los protones son donados o aceptados, pero se lleva a cabo mediante otro mecanismo.

La fase móvil entra en un capilar que está a una temperatura de entre 400 y 500 °C, todos los solventes y analitos son evaporados y el gas de salida se mezcla con gas nitrógeno. Se aplica una gran diferencia de potencial se aplica sobre una aguja de corona de descarga, generando un plasma de iones alrededor de esta corona.

Los iones se introducen en el espectrómetro a través de un sistema de rendijas de vacío, obteniéndose una gran sensibilidad debido a que el proceso de ionización se ha llevado a cabo a presión atmosférica. Se puede llegar a un caudal de 2 mL min<sup>-1</sup>. Lo más problemático es la destrucción de compuestos termolábiles en el capilar.



### Fotoionización a presión atmosférica

La fotoionización a presión atmosférica (APPI) es muy similar a APCI y se usa también para compuestos no polares, la introducción de la muestra se realiza de la misma manera, a través de un capilar a 500 °C, pero en este caso los fotones los genera una lámpara UV, generando la ionización por transferencia de energía de diferentes formas, la molécula puede ser ionizada mediante la formación de un radical catión por obtención de hidrógeno del solvente.

Para mejorar la ionización se pueden usar aceleradores como son el tolueno, el cual se ioniza formando los radicales catiónicos.



### Ionización por plasma acoplado inductivamente

La ionización por plasma acoplado inductivamente (ICP) es una fuente de iones que se utiliza en análisis elementales de metales. En el dispositivo ICP existen tres conductos encargados de introducir gas argón dentro de la antorcha de ICP, con una chispa los electrones se generan y aceleran hacia una bobina, esta aceleración se causa por la oscilación de un campo eléctrico generado en la bobina. El choque de los electrones con el gas argón generan una ionización del gas, aumentando la temperatura y generando el plasma.

A la temperatura de trabajo las moléculas de la muestra se introducen y son atomizadas, los átomos se ionizan por medio de la pérdida de un electrón, generando especies cargadas positivamente. Este tipo de ionización se aplica en detección de metales en muestras medioambientales y su límite de detección puede llegar hasta las partes por trillón.

La selección de la interfase a utilizar siempre va a realizarse en función de la muestra y de los analitos que se deseen determinar.

El uso de HPLC acoplada a espectrometría de masas es una técnica por los investigadores es cada vez más frecuente en la determinación de PAHs en muestras ambientales y en alimentos como se puede observar en la Tabla I.7. La sensibilidad que se consigue con este tipo de hibridación es del mismo orden que la conseguida con la combinación GC-MS. De esta manera, en un método desarrollado para la determinación de PAHs en de aceite de soja se consiguen límites de detección entre 0.02 y 0.76  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  (Camargo et al., 2001). Para muestras sólidas, tales como pescado se ha obtenido límites de detección entre 0.07 y 3.52  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  (Zhao et al., 2014).

### I.3.3.3 Espectrometría de masas en tándem

La combinación de dos espectrómetros de masas para la determinación de compuestos se conoce como espectrometría de masas en tándem (MS/MS,  $\text{MS}^2$ ). Con el uso de este acoplamiento se pueden estudiar iones específicos dentro de una muestra compleja para obtener su información estructural. El uso de la espectrometría de masas en tándem aumenta la sensibilidad y selectividad del método (Hoffmann y Stroobant, 2007).

Para realizar este acoplamiento se utiliza una cámara de colisiones, lo cual nos proporciona una mayor información sobre los compuestos a analizar. El primero de los analizadores tiene como objetivo el seleccionar y discriminar los iones de interés de los que no nos interesan, a continuación, se introducen en una cámara de colisiones, presurizada con gas helio. Los iones colisionarán con los átomos presentes, disociándose y acto seguido son introducidos en el segundo analizador y finalmente al detector.

Para la espectrometría de masas en tándem se utilizan normalmente el analizador triple cuadrupolo (QqQ), analizador de tiempo de vuelo (ToF) o el analizador trampa de iones (Q-Trap).



Analizador triple cuadrupolo

En el analizador de triple cuadrupolo (QqQ) el primero de los cuadrupolos se encarga de realizar el mismo trabajo que se explica en el apartado II.3.3.3 para el cuadrupolo simple, este va a seleccionar las moléculas de interés y pasarán a la cámara de colisiones (Figura I.25). En la cámara de colisiones se dispone de otro cuadrupolo encargado de acelerar el proceso de choque y fragmentación de los iones junto al gas de colisión, tras esto, los iones son introducidos en un último cuadrupolo y por último al detector, detectando en este caso no los iones precursores como se realizaría en el caso de un cuadrupolo simple, sino que se detecta el ion producto de la fragmentación, dando información estructural de los analitos.

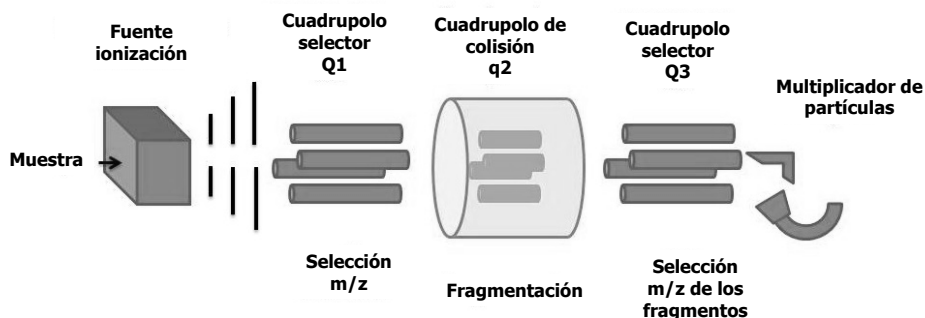


Fig. I.25. Esquema del analizador de triple cuadrupolo

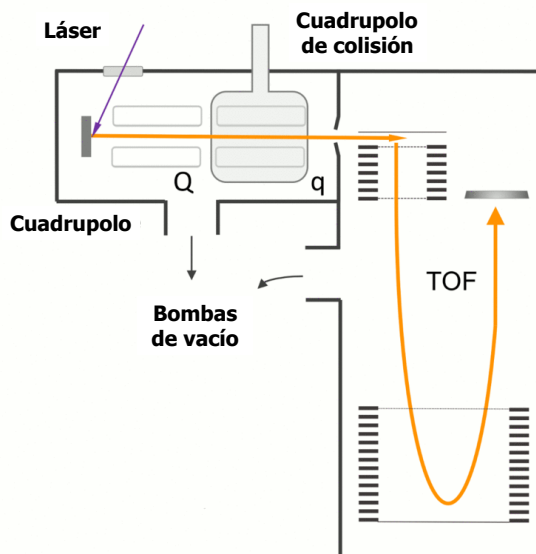


Analizador de tiempo de vuelo

Los espectrómetros de masas de tiempo de vuelo (TOF) basan la separación en el tiempo de vuelo de los iones en un tubo de deriva libre de campos. Los iones se introducen en el TOF entre dos platos y se aplica una gran diferencia de potencial para acelerar los iones.

Los iones al entrar en una zona de vacío y libre de campos van a determinar su movimiento por su energía cinética adquirida, la cual dependerá de su estructura y tamaño. La velocidad que alcanzan es proporcional a su valor  $m/z$ , los iones pesados tienen más tiempo de vuelo que los ligeros (Figura I.26).

Este tipo de analizador tiene una alta exactitud de masas, siendo su gran ventaja, el uso de uno o dos tubos de deriva permitirá el aumento de resolución.



**Fig. I.26.** Esquema del analizador cuadrupolo tiempo de vuelo



#### Analizador de trampa de iones

Como ocurre con los cuadrupolos, la separación en la trampa de iones (Q-Trap) se realiza mediante la estabilidad de estos en un campo eléctrico oscilante. La trampa de iones está formada por un electrodo de anillo y dos electrodos de capa, en los que se aplican las diferencias de potencial.

Los iones entran en la trampa de iones por un orificio en uno de los electrodos capa, son enfriados con helio a baja presión y se atrapan en el campo eléctrico. Realizando un barrido de voltajes se hace que algunos iones salgan de la trampa, desde los más ligeros a los más pesados, lo cual permite la detección. Gracias a la alta velocidad de barrido se pueden llevar a cabo ensayos rápidos.

En las Tablas I.6 y I.7 se puede encontrar algunas de las metodologías más representativas para la determinación de PAHs mediante técnicas cromatográficas acopladas a espectrometrías de masas en tándem.

### I.3.4 Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (CE) es una técnica de separación que se basa en las diferentes movilidades electroforéticas de las sustancias a analizar mediante la aplicación de un campo magnético en el interior de un capilar (Dabrio, 2000).

Esta técnica presenta algunas ventajas como son los reducidos tiempos de separación, normalmente por debajo de los 30 minutos, aunque podría darse la separación en unos minutos solamente. Tiene una elevada eficacia, con un intervalo de  $10^5$ - $10^6$  platos teóricos por metro de columna, para la separación sólo son necesarios unos nanolitros y es fácilmente automatizable.

Las dimensiones del tubo capilar suelen ser de unos 25 a 100  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y 25 a 100 cm de longitud (Dabrio, 2000), el material más utilizado para el relleno de la columna es la sílice fundida y se rellena de disolución tampón.

Las sustancias son introducidas dentro del capilar mediante presión, vacío o electromigración y se desplazan por el interior del capilar hasta llegar a la zona de detección, que está dentro de la misma columna, la señal se manda a un convertidor y se obtiene un electroforegrama de la muestra introducida.

Frente a la técnica de HPLC se observa que en la CE presenta mejores eficacias de separación al tener un perfil del flujo del tampón plano, necesita menos muestra y es más rápida, pero la reproducibilidad es mucho peor, siendo complementarias la una de la otra al tener mecanismos de separación diferentes (Dabrio, 2000).

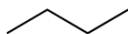
Para la técnica de CE se han adaptado los detectores de HPLC, como es el caso de los detectores ultravioleta-visible, diodos en serie, fluorescencia y espectrometría de masas. En la Tabla I.8 se muestran algunos métodos desarrollados para la determinación de PAHs en diferentes tipos de matrices mediante el uso de la técnica de CE.

**Tabla 1.8.** Métodos para la determinación de PAHs en diferentes matrices basado en el uso de la técnica de electroforesis capilar.

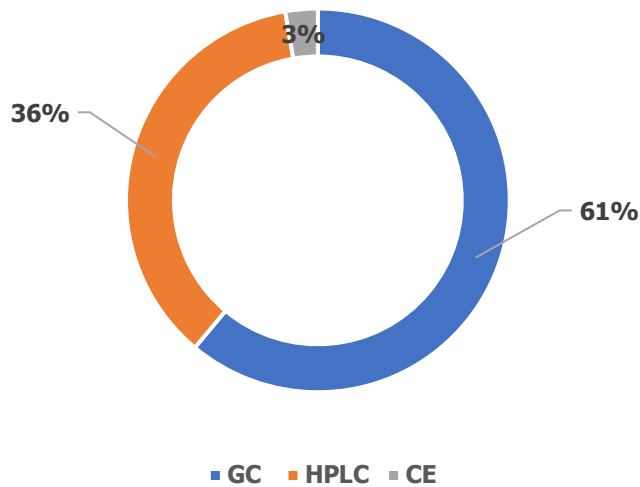
Muestra	Tratamiento de muestra <sup>a</sup>	Método de determinación	Características analíticas <sup>b</sup>	Referencia
Suelo	SLE	CE-UV-VisDAD	R:45–90% LOD: 0.5 ng	Bruggemann y Freitagl, 1995
Agua	Sohxlet	CE-ACPI-MS	R: 49.3-105.4% RSD: 2.3-12.2 % LOD: $3 \cdot 10^4 - 1 \cdot 10^5$ ng L <sup>-1</sup>	Cheng et al.,2013a
Ostras y suelo	Sohxlet UAE	CE-ACPI-MSCE-UV-VIS	RSD: 2.3–12.2 % LOD: 1.3–37.5 ng g <sup>-1</sup> <sup>1</sup> LOD: $1 \cdot 10^5 - 2 \cdot 10^5$ ng L <sup>-1</sup>	Cheng et al.,2013b
Aceites de colza, girasol y semilla de uva	SPE	CE-FLD	RSD: 2.3–6.2%	Ferey et al., 2013
Aceites de colza, girasol y semilla de uva	SPE	CE-FLD	LOQ: 10-1000 µg L <sup>-1</sup> RSD: 1.2–4.9%	Ferey et al., 2014
Leche	QuEChERS	CE	-	Knobel y Campiglia, 2013
Agua de río	LLE	CE-UV-Vis	LOD: 3.6 ng L <sup>-1</sup>	Takagai et al., 2006
Disoluciones estándar Agua	LLE-LLE	CE-UV-VISDAD	LOD: $1.6-4.8 \cdot 10^{-9}$ mol L <sup>-1</sup> R: 97–.5-102% RSD: 4 %	Takagai et ay Igarashil., 2001
Agua de lluvia, de río y de manantial	LLE	CE-UV-Vis	LOD: $10^{-10} - 10^{-9}$ mol L <sup>-1</sup>	Takagai y Igarashi, 2002
Suelo	UAE	CE-UV	LOD: 0.1–2 µg L <sup>-1</sup> R: 95–105%	Zhang et al.,1997
Agua de lago	-	CE-DAD	R: 92–1.8-108.1% RSD: 4.7–1-6.65 % LOD: $9 \cdot 10^5 0.9 - 7.3 \cdot \mu 10^5$ ng L <sup>-1</sup>	Zhang et al.,2012

<sup>a</sup> LLE: extracción líquido-líquido, SPE: extracción en fase sólida; UAE: extracción asistida por ultrasonidos, SLE: extracción sólido-líquido.

<sup>b</sup> LOD: límite de detección, LOQ: límite de cuantificación, r: coeficiente de correlación, RSD: desviación estándar relativa, R: recuperación; RL: intervalo lineal



Las técnicas de cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta eficacia son las más utilizadas para la determinación de PAHs en muestras ambientales y de alimentos, siendo la GC la técnica prevalente frente a la HPLC como se puede observar en los datos extraídos de las publicaciones recientemente publicadas en la Figura I.27.



**Fig. I.27.** Porcentaje de aplicación de las distintas técnicas de determinación para hidrocarburos policíclicos aromáticos en muestras ambientales y alimentos en las publicaciones aparecida en el periodo 2010-2017. [Fuente ScienceDirect; palabras clave: “PAHs”, “environmental samples”, “food samples”, “gas chromatography” (GC), “liquid cromatography” (HPLC), “capillary electrochrophoresis” (CE)]

## I.4 Referencias

- AECOSAN. (2017), Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), Ficha técnica. Disponible: <https://goo.gl/QCmejy>
- Alarcón F., Báez M. E., Bravo M., Richter P., & Fuentes E. (2012). Screening of edible oils for polycyclic aromatic hydrocarbons using microwave-assisted liquid-liquid and solid phase extraction coupled to one- to three-way fluorescence spectroscopy analysis. *Talanta*, 100, 439–446.
- Alldrick A. J. (2012). Chemical contamination of cereals. In D. Schrenk (ed.), *Chemical Contaminants and Residues in Food*. Oxford: Woodhead Publishing, pp. 421–446.
- Alomirah H., Al-Zenki S., Al-Hooti S., Zaghoul S., Sawaya W., Ahmed N., & Kannan K. (2011). Concentrations and dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from grilled and smoked foods. *Food Control*, 22(12), 2028–2035.
- Anyakora C. (2007). Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. In: Nollet, L.M.L (Ed.), *Handbook of Water Analysis*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis, Group, pp. 579-595.
- ASTDR. (2017). Agency for Toxic Substances and Disease Registry Substance Priority List. Disponible: [https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html#modalIdString\\_myTable2017](https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html#modalIdString_myTable2017)
- Azzouz A., Souhail B., & Ballesteros E. (2010). Continuous solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of pharmaceuticals and hormones in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1217(17), 2956–2963.
- Baird C. (2001). Compuestos químicos tóxicos. "Química Ambiental". Barcelona: Reverté, Capítulos 6-7, pp. 299-425.
- Ballesteros E., García Sánchez A., & Ramos Martos N. (2006). Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1111(1), 89–96.
- Bandowe B. A. M., Bigalke M., Boamah L., Nyarko E., Saalia F. K., & Wilcke W. (2014). Polycyclic aromatic compounds (PAHs and oxygenated PAHs) and trace metals in fish species from Ghana (West Africa): Bioaccumulation and health risk assessment. *Environment International*, 65, 135–146.
-

- Barco-Bonilla N., Romero-González R., Plaza-Bolaños P., Fernández-Moreno J. L., Garrido Frenich A., & Martínez Vidal J. L. (2011). Comprehensive analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater using stir bar sorptive extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 693(1–2), 62–71.
- Barhoumi B., El Megdiche Y., Clérandeau C., Ameer W. Ben, Mekni S., Bouabdallah S., & Driss M. R. (2016). Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and eel (*Anguilla anguilla*) from Bizerte lagoon, Tunisia, and associated human health risk assessment. *Continental Shelf Research*, 124, 104–116.
- Belitz H.D., Grosch W., & Schieberle P. (2004). *Alcoholic Beverages*. "Food Chemistry" 3<sup>o</sup> Edición. Garching: Springer.
- Bishnoi N. R., Mehta U., Sain U., & Pandit G. G. (2005). Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea and coffee samples of Mumbai City (India) by high performance liquid chromatography. *Environmental Monitoring and Assessment*, 107(1–3), 399–406.
- BOE. (2015). Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental. BOE Núm. 219, 80582–80677.
- Bogusz M. J., El Hajj S. A., Ehaideb Z., Hassan H., & Al-Tufail M. (2004). Rapid determination of benzo(a)pyrene in olive oil samples with solid-phase extraction and low-pressure, wide-bore gas chromatography-mass spectrometry and fast liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1026(1–2), 1–7.
- Bruggemann O., & Freitag R. (1995). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil samples by micellar electrokinetic capillary chromatography with photodiode-array detection. *Journal of Chromatography A*, 717, 309–324.
- Cacho J. I., Campillo N., Viñas P., & Hernández-Córdoba M. (2014). Use of headspace sorptive extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of volatile polycyclic aromatic hydrocarbons in herbal infusions. *Journal of Chromatography A*, 1356, 38–44.
- Cámara Rica C., Fernández Hernando P., Matín-Esteban A., Pérez Conde C., & Vidal, M. (1997). *Toma y tratamiento de muestras*. Madrid: Síntesis.

- Camargo M. C. R., Antonioli P. R., & Vicente E. (2011). HPLC-FLD simultaneous determination of 13 polycyclic aromatic hydrocarbons: Validation of an analytical procedure for soybean oils. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(7), 1354–1361.
- Camino-Sánchez F. J., Rodríguez-Gómez R., Zafra-Gómez A., Santos-Fandila A., & Vilchez J. L. (2014). Stir bar sorptive extraction: Recent applications, limitations and future trends. *Talanta*, 130, 388–399.
- Cela R., Lorenzo R.A., & Casais M. A. (2003). *Técnicas de Separación en Química Analítica*. Madrid, Ed. Síntesis.
- Cerdá V. (2006). *Introducción a los Métodos de Análisis en Flujo*. Palma de Mallorca. Ed. Sciware.
- CFIA. (2018). Health Canada's Maximum Levels for Chemical Contaminants in Foods. Canadian Food Inspection Agency. Disponible: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/chemical-contaminants/maximum-levels-chemical-contaminants-foods.html#a1>
- Cheng X., Forsythe J., & Peterkin E. (2013a). Some factors affecting SPME analysis and PAHs in Philadelphia's urban waterways. *Water Research*, 47(7), 2331–2340.
- Cheng Y. J., Huang S. H., Chiu J. Y., Liu W. L., & Huang H. Y. (2013b). Analyses of polycyclic aromatic hydrocarbons in seafood by capillary electrochromatography-atmospheric pressure chemical ionization/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1313, 132–138.
- China National Standard. (2012). *Maximum Levels of Conaminants in Food GB 2762-2012*. National Standard of the People's Republic of China.
- Chinnici F., Natali N., Spinabelli U., & Riponi C. (2007). Presence of polycyclic aromatic hydrocarbons in woody chips used as adjuvant in wines, vinegars and distillates. *LWT - Food Science and Technology*, 40(9), 1587–1592.
- Colmsjö A. (2010). *Concentration and extraction of PAHs from environmental samples. "PAHs and related compounds"*. New York: Springer, Capítulo 2, pp. 55–77.
- Conceicao Fernandes M. (2004). *Comportamiento de plaguicidas en suelos de Andalucía Occidental y Bajo Alentejo: Efecto de la adición de enmiendas orgánicas*. Sevilla: Universidad de Sevilla.
-

- Dabrio M. (2000). *Cromatografía de líquidos de alta eficacia. "Cromatografía y Electroforesis en Columna"*. Barcelona: Ed. Springer-Verlag.
- Dayana A. (2008). *Liquid chromatography: mass spectrometry for detection and characterization of DNA biomarkers and reactive metabolites*. Boston: Northeast University.
- De la Guardia M., & Garrigues S. (2012). *Handbook of Green Analytical Chemistry*. New York: John Wiley & Sons, Ltd.
- De Lima R. F., Dionello R. G., Peralba M. do C. R., Barrionuevo S., Radunz L. L., & Reichert Júnior F. W. (2017). PAHs in corn grains submitted to drying with firewood. *Food Chemistry*, 215, 165–170.
- Delgado B., Pino V., Ayala J. H., González V., & Afonso A. M. (2004). Nonionic surfactant mixtures: A new cloud-point extraction approach for the determination of PAHs in seawater using HPLC with fluorimetric detection. *Analytica Chimica Acta*, 518(1–2), 165–172.
- Dost K., & Deli C. (2012). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils and barbecued food by HPLC/UV-Vis detection. *Food Chemistry*, 133(1), 193–199.
- Drabova L., Pulkrabova J., Kalachova K., Tomaniova M., Kocourek V., & Hajslova J. (2012). Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tea using two-dimensional gas chromatography coupled with time of flight mass spectrometry. *Talanta*, 100, 207–216.
- Duedahl-Olesen L. (2013). *Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in foods. Persistent Organic Pollutants and Toxic Metals in Foods*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Duedahl-Olesen L., Aaslyng M., Meinert L., Christensen T., Jensen A. H., & Binderup M. L. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in Danish barbecued meat. *Food Control*, 57, 169–176.
- EFSA. (2012). Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on Mineral Oil Hydrocarbons in Food. *EFSA Journal*, 10(6), 2704.
- EPA. (2016). Environmental Protection Agency Regulation 816-F-09-004. National primary drinking water regulation.

- Escarrone A. L. V, Caldas S. S., Furlong E. B., Meneghetti V. L., Fagundes C. A. A., Arias J. L. O., & Primel E. G. (2014). Polycyclic aromatic hydrocarbons in rice grain dried by different processes: Evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method. *Food Chemistry*, 146, 597–602.
- Essumang D. K., Dodoo D. K., & Adjei J. K. (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination in smoke-cured fish products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27(2), 128–138.
- FAO. (2009). CAC/RCP 68-2009, Código de prácticas para reducir la contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en los alimentos producidos por procedimientos de ahumado y secado directo.
- FAO. (2017). FAOSTAT statistical databases. Food and Agriculture Organization of the Organization. United Nations. Disponible: <http://faostat.fao.org>
- Farhadian A., Jinap S., Abas F., & Sakar Z. I. (2010). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat. *Food Control*, 21(5), 606–610.
- Ferey L., Delaunay N., Rutledge D.N., Huertas A., Raoul Y., Gareil P., Vial J., & Rivalsh I. (2013). Use of response surface methodology to optimize the simultaneous separation of eight polycyclic aromatic hydrocarbons by capillary zone electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1302, 181–190.
- Ferey L., Delaunay N., Rutledge D.N., Huertas A., Raoul Y., Gareil P., Vial J., & Rivalsh I. (2014). Optimizing separation conditions of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis and applications to edible oils. *Talanta*, 119, 572–581.
- Fernandes M. B., Sicre M. A., Broyelle I., Lorre A., & Pont D. (1999). Contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in French and European rivers. *Hydrobiologia*, 410, 343–348.
- Fiedler H., Cheung C. K., & Wong M. H. (2002). PCDD/PCDF, chlorinated pesticides and PAH in Chinese teas. *Chemosphere*, 46(9–10), 1429–1433.
- Fraga C. G. (2005). Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 235–244.
-

- Fu J., B. Mai, G. Sheng, G. Zhang, X. Wang, P. Peng, & U.W. Tang. (2003). Persistent organic pollutants in environmental of the Pearl River Delta, China: An Overview, *Chemosphere*, 52, 1411–1422.
- Galinaro C. A., & Franco D. W. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Cahaça, rum, whisky and alcohol fuel. *Quimica Nova*, 32(6), 1447–1451.
- García Londoño, V. A., Reynoso, C. M., & Resnik, S. L. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) survey on tea (*Camellia sinensis*) commercialized in Argentina. *Food Control*, 50, 31–37.
- García-Falcón M. S., & Simal-Gándara J. (2005). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in alcoholic drinks and the identification of their potential sources. *Food Additives and Contaminants*, 22(9), 791–797.
- García-Falcón M. S., Cancho-Grande B., & Simal-Gándara J. (2005). Minimal clean-up and rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in instant coffee. *Food Chemistry*, 90(4), 643–647.
- Germán-Hernández M., Pino V., Anderson J. L., & Afonso A. M. (2011). Use of ionic liquid aggregates of 1-hexadecyl-3-butyl imidazolium bromide in a focused-microwave assisted extraction method followed by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection to determine the 15 + 1 EU priority. *Talanta*, 85(2), 1199–1206.
- Gharbi I., Moret S., Chaari O., Issaoui M., Conte L. S., Lucci P., & Hammami M. (2017). Evaluation of hydrocarbon contaminants in olives and virgin olive oils from Tunisia. *Food Control*, 75, 160–166.
- Ghasemzadeh-Mohammadi V., Mohammadi A., Hashemi M., Khaksar R., & Haratian P. (2012). Microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for isolation and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish. *Journal of Chromatography A*, 1237, 30–36.
- González-Curbelo M., Socas-Rodríguez B., Herrera-Herrera A. V., González-Sálamo J., Hernández-Borges J., & Rodríguez-Delgado M. (2015). Evolution and applications of the QuEChERS method. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 169–185.
- Gross J. H. (2017). *Mass Spectrometry*. Berlín: Springer.

- Grover I. S., Sharma R., Singh S., & Pal B. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons in some grounded coffee brands. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(8), 6459–6463.
- Guillen M. D., Sopelana P., & Partearroyo M. A. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavorings obtained from different types of wood. Effect of storage in polyethylene flasks on their concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 5083–5087.
- Guíñez M., Canales R., Martínez L. D., & Cerutti S. (2018). Solvent-based de-emulsification dispersive liquid–liquid microextraction coupled with UPLC-MS/MS for the fast determination of ultratrace levels of nitrated and oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. *Analytical Methods*, 10, 910–919.
- Harvey R. G. (1998). *Environmental Chemistry of PAHs. "PAHs and related compounds"*. New York: Springer Capítulo 1, Pág 1-55.
- Hoffmann E., & Stroobant V. (2007). *Mass Spectrometry. Principles and Applications*. New York: Ed. John Wiley & Sons, Ltd.
- Hollosi L., & Wenzl T. (2011). Development and optimisation of a dopant assisted liquid chromatographic-atmospheric pressure photo ionisation-tandem mass spectrometric method for the determination of 15+1 EU priority PAHs in edible oils. *Journal of Chromatography A*, 1218(1), 23–31.
- Howsam M., & Jones K. (1998). Sources of PAHs in the environment. "PAHs and related compounds". New York: Springer, Capítulo 4, pp.137-175.
- Ince, M., & Yaman, M. (2012). High performance liquid chromatography-mass spectrometry for determination of benzo[a]pyrene in grilled meat foods. *Asian Journal of Chemistry*, 24(8), 2–7.
- Jahurul M. H. A., Jinap S., Zaidul I. S. M., Sahena F., Farhadian A., & Hajeb P. (2013). Determination of fluoranthene, benzo[b]fluoranthene and benzo[a]pyrene in meat and fish products and their intake by Malaysian. *Food Bioscience*, 1, 73–80.
- Jurado-Sánchez B., Ballesteros E., & Gallego M. (2014). Analytical method for biomonitoring of perfluoroalkyl acids in human urine. *Talanta*, 128, 141–146.
- Kamankesh M., Mohammadi A., Hosseini H., & Modarres Tehrani Z. (2015). Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat using microwave-assisted extraction
-

- and dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Meat Science*, 103, 61–67.
- Kästner, M. (2000). Degradation of aromatic and polyaromatic compounds. In *Environmental processes II: Soil decontamination, biotechnology*. Rehm, H.J., Reed G., Pühler A., & Stadler P., (eds). New York: Wiley VCH.
- Kawaguchi M., Takatsu A., Ito R., & Nakazawa H. (2013). Applications of stir-bar sorptive extraction to food analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 45, 280–293.
- Kayali Sayadi M. N., Rubio Barroso S., Cuesta Jiménez M. P., & Polo Díez L. M. (1998). Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea infusion samples by high-performance liquid chromatography and fluorimetric detection based on solid-phase extraction. *Analyst*, 123(10), 2145–2148.
- Kellner R., Mermet J. M., Otto M., Valcárcel M., & Widmer H. M. (2004). *Coupling of Chromatographic and Spectroscopic Techniques*. “Analytical Chemistry”. 2º Edición. Ed. Wiley-VCH Capítulo 26, Pág 865-895.
- Knobel G., & Campiglia A. D. (2013). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in milk by a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction and capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, 36(14), 2291–2298.
- Ledesma E., Rendueles M., & Díaz M. (2015). Spanish smoked meat products: Benzo(a)pyrene (BaP) contamination and moisture. *Journal of Food Composition and Analysis*, 37(1881), 87–94.
- Li G., Wu S., Wang L., & Akoh C. C. (2016a). Concentration, dietary exposure and health risk estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in youtiao, a Chinese traditional fried food. *Food Control*, 59, 328–336.
- Li G., Wu S., Zeng J., Wang L., & Yu W. (2016b). Effect of frying and aluminium on the levels and migration of parent and oxygenated PAHs in a popular Chinese fried bread youtiao. *Food Chemistry*, 209, 123–130.
- Li X. Y., Li N., Luo H. D., Lin L. R., Zou Z. X., Jia Y. Z., & Li Y. Q. (2011). A novel synchronous fluorescence spectroscopic approach for the rapid determination of three polycyclic aromatic hydrocarbons in tea with simple microwave-assisted pretreatment of sample. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), 5899–5905.

- Lin D., Tu Y., & Zhu L. (2005). Concentrations and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea. *Food and Chemical Toxicology*, 43(1), 41–48.
- Liu X., & Korenaga T. (2001). Dynamics analysis for the distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in rice. *Journal of Health Science*, 47(5), 446–451.
- Loh S. H., Sanagi M. M., Wan Ibrahim W. A., & Hasan M. N. (2013). Multi-walled carbon nanotube-impregnated agarose film microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in green tea beverage. *Talanta*, 106, 200–205.
- Lord H & Pawliszyn J. (2000). Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*, 885: 153–193.
- Lu F., Kuhnle G. K., & Cheng Q. (2017). Heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in commercial ready-to-eat meat products on UK market. *Food Control*, 73, 306–315.
- Lundanes E. Reubsaet L., & Greibrokk T. (2014). *Chromatography: Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods*. New York: Wiley VCH.
- Luo D., Yu Q. W., Yin H. R., & Feng Y. Q. (2007). Humic acid-bonded silica as a novel sorbent for solid-phase extraction of benzo[a]pyrene in edible oils. *Analytica Chimica Acta*, 588(2), 261–267.
- Ma J., Xiao R., Li J., Yu J., Zhang Y., & Chen L. (2010). Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples by solid-phase extraction using multi-walled carbon nanotubes as adsorbent coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(34), 5462–5469.
- Machado A. M. D. R., Cardoso M. D. G., Dórea H. S., Emídio E. S., Silva M. M. S., Dos Anjos J. P., & Nelson D. L. (2014). Contamination of cachaça by PAHs from storage containers. *Food Chemistry*, 146, 65–70.
- Mafra I., Amaral J. S., & Oliveira M. B. P. P. (2010). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in Olive Oils and Other Vegetable Oils; Potential for Carcinogenesis. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, 489–498.
- Martorell I., Nieto A., Nadal M., Perelló G., Marcé R. M., & Domingo J. L. (2012). Human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using data from a duplicate diet study in Catalonia, Spain. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11), 4103–4108.
-

- Martorell I., Perelló G., Martí-Cid R., Castell V., Llobet J. M., & Domingo J. L. (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in foods and estimated PAH intake by the population of Catalonia, Spain: Temporal trend. *Environment International*, 36(5), 424–432.
- Mondello L. (2011). *Comprehensive Chromatography in Combination with Mass Spectrometry*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Montuori P., & Triassi M. (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbons loads into the Mediterranean Sea: Estimate of Sarno River inputs. *Marine Pollution Bulletin*, 64(3), 512–520.
- Moret S., Purcaro G., & Conte L. S. (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) levels in propolis and propolis-based dietary supplements from the Italian market. *Food Chemistry*, 122(1), 333–338.
- Nwaichi E. O., & Ntorgbo S. A. (2016). Assessment of PAHs levels in some fish and seafood from different coastal waters in the Niger Delta. *Toxicology Reports*, 3, 167–172.
- Orecchio S., Ciotti V. P., & Culotta L. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coffee brew samples: Analytical method by GC-MS, profile, levels and sources. *Food and Chemical Toxicology*, 47(4), 819–826.
- Pena T., Pensado L., Casais C., Mejuto C., Phan-Tan-Luu R., & Cela R. (2006). Optimization of a microwave-assisted extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons from fish samples. *Journal of Chromatography A*, 1121(2), 163–169.
- Pincemaille J., Schummer C., Heinen E., & Moris G. (2014). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked and non-smoked black teas and tea infusions. *Food Chemistry*, 145, 807–813.
- Pitipanapong J., Chitprasert S., Goto M., Jiratchariyakul W., Sasaki M., & Shotipruk A. (2007). New approach for extraction of charantin from *Momordica charantia* with pressurized liquid extraction. *Separation and Purification Technology*, 52(3), 416–422.
- Pizzini S., Piazza R., Cozzi G., & Barbante C. (2016). Simultaneous determination of halogenated contaminants and polycyclic aromatic hydrocarbons: a multi-analyte method applied to filter-feeding edible organisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(28), 7991–7999.

- Poster D.L., Sander L. C., & Wise S. A. (1998). Chromatographic methods of analysis for the determination of PAHs in environmental samples. "PAHs and related compounds". New York, Ed. Springer Capítulo 3, Pág 77–137.
- Purcaro G., Moret S., & Conte L. S. (2009). Optimisation of microwave assisted extraction (MAE) for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) determination in smoked meat. *Meat Science*, 81(1), 275–280.
- Purcaro G., Picardo M., Barp L., Moret S., & Conte L. S. (2013). Direct-immersion solid-phase microextraction coupled to fast gas chromatography mass spectrometry as a purification step for polycyclic aromatic hydrocarbons determination in olive oil. *Journal of Chromatography A*, 1307, 166–171.
- Qin N., He W., Kong X. Z., Liu W. X., He Q. S., Yang B., & Xu F. L. (2013). Ecological risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the water from a large Chinese lake based on multiple indicators. *Ecological Indicators*, 24, 599–608.
- Ratola N., Lacorte S., Barceló D., & Alves A. (2009). Microwave-assisted extraction and ultrasonic extraction to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in needles and bark of *Pinus pinaster* Ait. and *Pinus pinea* L. by GC-MS. *Talanta*, 77(3), 1120–1128.
- Reilly C. (2002). Metals in food. In *Metal Contamination of Food: Its Significance for Food Quality and Human Health* (3rd ed.), edited by C. Reilly. Oxford: Blackwell Science, 12-229.
- Rey-Salgueiro L., García-Falcón M. S., Martínez-Carballo E., & Simal-Gándara J. (2008). Effects of toasting procedures on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread. *Food Chemistry*, 108(2), 607–615.
- Riachi L. G., Santos A., Moreira R. F. A., & De Maria C. A. B. (2014). A review of ethyl carbamate and polycyclic aromatic hydrocarbon contamination risk in cachaça and other Brazilian sugarcane spirits. *Food Chemistry*, 149, 159–169.
- Ridgway K., Lalljie S. P. D., & Smith R. M. (2007). Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A*, 1153(1–2), 36–53.
- Robles-Molina J., Gilbert-López B., García-Reyes J. F., Martos N. R., & Molina-Díaz A. (2011). Multiclass determination of pesticides and priority organic pollutants in fruit-based soft drinks by headspace solid-phase microextraction/gas chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 3(10), 2221.
-

- Rodríguez J.A., Aguilar-Arteaga K., Díez C. & Barrado E. (2013). Recent Advances in the Extraction of Triazines from Water Samples, *Herbicides - Advances in Research*, Dr. Andrew Price (Ed.), InTech, Disponible: <https://www.intechopen.com/books/herbicides-advances-in-research/recent-advances-in-the-extraction-of-triazines-from-water-samples>
- Rojo Camargo M. C., Antonioli P. R., & Vicente E. (2012). Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons content in different stages of soybean oils processing. *Food Chemistry*, 135(3), 937–942.
- Rouessac F., & Rouessac A. (2003). *Análisis Químico. Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas*. México: McGraw Hill.
- Rozentale I., Zacs D., Perkons I., & Bartkevics V. (2017). A comparison of gas chromatography coupled to tandem quadrupole mass spectrometry and high-resolution sector mass spectrometry for sensitive determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in cereal products. *Food Chemistry*, 221, 1291–1297
- Sadowska-Rociek A., Surma M., & Cieślik E. (2014). Comparison of different modifications on QuEChERS sample preparation method for PAHs determination in black, green, red and white tea. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(2), 1326–1338.
- Santonicola S., Albrizio S., Murru N., Ferrante M. C., & Mercogliano R. (2017). Study on the occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk and meat/fish based baby food available in Italy. *Chemosphere*, 184, 467–472.
- Sarria-Villa R., W. Ocampo-Duque, M. Páez, M. Schuhmacher. (2016). Presence of PAHs in water and sediments of the Colombian Cauca River during heavy rain episodes, and implications for risk assessment. *Science of the Total Environment* 540, 455-465.
- Schmidt M. L., & Snow N. H. (2016). Making the case for QuEChERS-gas chromatography of drugs. *Trends in Analytical Chemistry*, 75, 49–56.
- Shachman, M. (2004). Emulsions – The Cloudy drinks. In M. Shachman (Ed.), *The Soft Drinks Companion: A Technical Handbook for the Beverage Industry*. (pp. 41-53). London: CRC Press.
- Shi L. K., Zhang D. D., & Liu Y. L. (2016). Incidence and survey of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible vegetable oils in China. *Food Control*, 62, 165–170.

- Siemers A. K., Mänz J. S., Palm W. U., & Ruck W. K. L. (2015). Development and application of a simultaneous SPE-method for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), alkylated PAHs, heterocyclic PAHs (NSO-HET) and phenols in aqueous samples from German Rivers and the North Sea. *Chemosphere*, 122, 105–114.
- Silva, F. S., Cristale, J., Ribeiro, M. L., & de Marchi, M. R. R. (2011). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in raw cane sugar (rapadura) in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(3), 346–350.
- Simoneit B. R. T. (1998). Biomarker PAHs in the environment. "PAHs and related compounds". New York: Springer. Capítulo 5, pp. 175-223.
- Singh S., Vashishth A., & Vishal. (2011). PAHs in some brands of tea. *Environmental Monitoring and Assessment*, 177(1–4), 35–38.
- Skoog D.A., West D. M., Holler F. J., & Crouch S. R. (2017). Cromatografía líquida de alta resolución. "Fundamentos de química analítica". México: Springer. Capítulo 33, pág. 912-932.
- Snyder R. A., Vestal A., Welch C., Barnes G., Pelot R., Ederington-Hagy M., & Hileman F. (2014). PAH concentrations in Coquina (*Donax* spp.) on a sandy beach shoreline impacted by a marine oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, 83(1), 87–91.
- Sung, N. J. (2004). N-nitrosocompounds in food. In *Handbook of Food analysis*, edition no 2; Nollet L.M.L., Ed. New York: Marcel Dekker, Vol. 2, pp. 1403-1448.
- Takagai Y., & Igarashi S. (2001). UV-detection capillary electrophoresis for benzo[a]pyrene and pyrene following a two-step concentration system using homogeneous liquid-liquid extraction and a sweeping method. *Analyst*, 126(5), 551–552.
- Takagai Y., & Igarashi S. (2002). Homogeneous liquid-liquid extraction and micellar electrokinetic chromatography using sweeping effect concentration system for determination of trace amounts of several polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373(1–2), 87–92.
- Takagai Y., Akiyama R., & Igarashi S. (2006). Powerful preconcentration method for capillary electrophoresis and its application to analysis of ultratrace amounts of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385 (5), 888–894.
-

- Teixeira V. H., Casal S., & Oliveira M. B. P. P. (2007). PAHs content in sunflower, soybean and virgin olive oils: Evaluation in commercial samples and during refining process. *Food Chemistry*, 104(1), 106–112.
- Tfouni S. A. V., Serrate C. S., Leme F. M., Camargo M. C. R., Teles C. R. A., Cipolli K. M. V. A. B., & Furlani R. P. Z. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee brew: Influence of roasting and brewing procedures in two *Coffea* cultivars. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 526–530.
- Tfouni S. A. V., Souza N. G., Neto M. B., Loredó I. S. D., Leme F. M., & Furlani R. P. Z. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sugarcane juice. *Food Chemistry*, 116(1), 391–394.
- Thea A. E., Ferreira D., Brumovsky L. A., & Schmalko M. E. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in yerba maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil) traditional infusions (mate and tereré). *Food Control*, 60, 215–220.
- Thirugnanasambandham K., Sivakumar V., & Maran J. P. (2015). Microwave-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1–5.
- Unión Europea. (2005). Recomendación de la Comisión nº 2005/108/EC CE: Recomendación de la Comisión, de 4 de febrero de 2005, relativa a las investigaciones complementarias sobre los niveles de hidrocarburos aromáticos policíclicos en determinados alimentos [notificada con el número C (2005) 256. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L34, 43–45.
- Unión Europea. (2006). REGLAMENTO de la Comisión (CE) N 1881/2006 de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 364, 5–24.
- Unión Europea. (2008). Directiva 2008/105/CE Normas de calidad ambiental aplicables a las aguas superficiales. Parlamento Europeo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L348, 84–97.
- Unión Europea. (2010). European Water Framework Brochure: Water is For Life, Comisión Europea.
- Unión Europea. (2011). REGLAMENTO (UE) N ° 835/2011 DE LA COMISIÓN, de 19 de agosto de 2011, que modifica el Reglamento (CE) n ° 1881/2006 por lo que respecta al contenido

máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los productos alimenticios Texto pertinente a efectos del EEE. Diario Oficial de la Unión Europea, L215, 4–8.

Unión Europea. (2015). REGLAMENTO (UE) 2015/1933 DE LA COMISIÓN de 27 de octubre de 2015 que modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en la fibra de cacao, los chips de plátano, los complementos alimenticios, las hierbas secas y las especias secas. Diario Oficial de la Unión Europea, L282, 11–13.

USEPA. (2012). United States Environmental Protection Agency. Appendix A to 40 CFR, Part 423-26. Washington, D.C.

Valcárcel M., Cárdenas M. S. (2000). Automatización y miniaturización en Química Analítica. Barcelona: Ed. Springer.

Vichi S., Pizzale L., Conte L. S., Buxaderas S., & López-Tamames E. (2005). Simultaneous determination of volatile and semi-volatile aromatic hydrocarbons in virgin olive oil by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1090(1–2), 146–154.

Vichi S. Pizzale L., Conte L. S., Buxaderas S., & López-Tamames E. (2007). The occurrence of volatile and semi-volatile aromatic hydrocarbons in virgin olive oils from north-eastern Italy. *Food Control*, 18(10), 1204–1210. Viegas O., Novo P., Pinho O., & Ferreira I. M. P. L. V. O. (2012). A comparison of the extraction procedures and quantification methods for the chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal grilled meat and fish. *Talanta*, 88, 677–683.

Wei M.C., & Jen J.F. (2007). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples by microwave assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/flame ionization detection. *Talanta*, 72(4), 1269–74.

Werres F., Balsaa P., & Schmidt T. C. (2009). Total concentration analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples with high suspended particulate matter content. *Journal of Chromatography A*, 1216(12), 2235–2240.

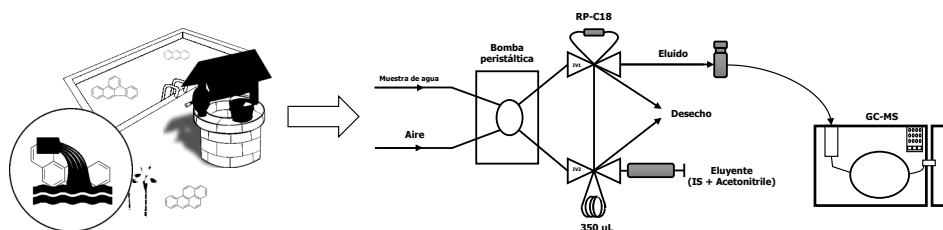
Wretling S., Eriksson A., Eskhult G. A., & Larsson B. (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Swedish smoked meat and fish. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(3), 264–272.

- Wu S., & Yu W. (2012). Liquid-liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in four different edible oils from China. *Food Chemistry*, 134(1), 597–601.
- Yebra-Pimentel I., Fernández-González R., Martínez-Carballo E., & Simal-Gándara J. (2014). Optimization of purification processes to remove polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in polluted raw fish oils. *Science of the Total Environment*, 470–471, 917–924.
- Zachara A., Galkowska D., & Juszcak L. (2017). Contamination of smoked meat and fish products from Polish market with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Food Control*, 80, 45–51.
- Zhang X.X., Yang Y., Korenaga T. (1997). Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in Environmental Samples by Capillary Electrophoresis. *Analytical Sciences*, 13, 235–238.
- Zhang Z. L., Hong H. S., Zhou J. L., & Yu G. (2004). Phase association of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Minjiang River Estuary, China. *Science of the Total Environment*, 323(1–3), 71–86.
- Zhang, J., Bao, T., & Chen, Z. (2012). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons on SMA-EGDMA polymeric monolith column by capillary electrochromatography. *Analytical Methods*, 4(12), 4140.
- Zhao Z., Zhang L., Cai Y., & Chen Y. (2014). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) residues in several tissues of edible fishes from the largest freshwater lake in China, Poyang Lake, and associated human health risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104(1), 323–331.
- Zhi H., Zhao Z., & Zhang L. (2015). The fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organochlorine pesticides (OCPs) in water from Poyang Lake, the largest freshwater lake in China. *Chemosphere*, 119, 1134–1140.
- Zhou R., Jiang J., Mao T., Zhao Y., & Lu Y. (2016). Multiresidue analysis of environmental pollutants in edible vegetable oils by gas chromatography – tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 207, 43–50.
- Zougagh M., Redigolo H., Ríos A., & Valcárcel M. (2004). Screening and confirmation of PAHs in vegetable oil samples by use of supercritical fluid extraction in conjunction with liquid chromatography and fluorimetric detection. *Analytica Chimica Acta*, 525(2), 265–271.

Zuin V. G., Montero L., Bauer C., & Popp P. (2005). Stir bar sorptive extraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Mate teas. *Journal of Chromatography A*, 1091(1–2), 2–10.

---





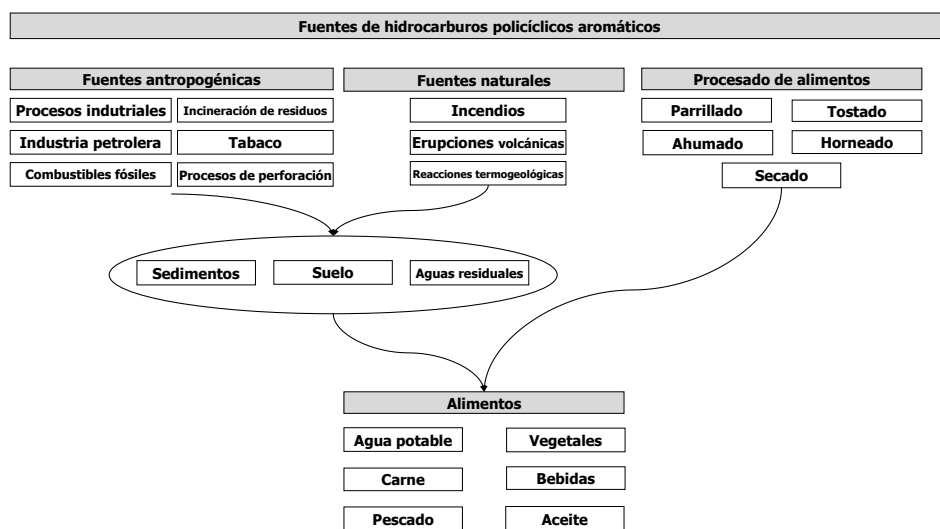
## II. Determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos en aguas medioambientales del sur de España mediante el uso de un sistema continuo de extracción en fase sólida y cromatografía de gases-espectrometría de masas



Rascón Andrés J., Azzouz Abdelmonaim, Ballesteros Evaristo (2018) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental waters from southern Spain by using a continuous solid-phase extraction system and gas chromatography-mass spectrometry. *Environmental Chemistry* **15**, 351-361.

<https://doi.org/10.1071/EN18106>

Las fuentes de hidrocarburos policíclicos aromáticos en muestras ambientales pueden ser antropogénicas, contaminación causada por el ser humano y sus actividades, y naturales. Estos factores contaminan al suelo, los sedimentos y las aguas que finalmente acabarán llegando a los alimentos de manera directa o indirecta. Además, en los alimentos hay que indicar que, durante el procesado de los mismos, ya sea en casa o en la industria se pueden producir PAHs como se puede observar en la Figura II.1.



**Fig. II.1.** Esquema de las rutas de contaminación por PAHs de muestras ambientales y alimentos

En este Capítulo se ha desarrollado una metodología para la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos en muestras de aguas medioambientales. En primer lugar, se ha puesto a punto un sistema continuo de extracción en fase sólida para la determinación de 16 hidrocarburos policíclicos aromáticos: naftaleno (Nap), acenaftileno (Ap), acenafteno (Ac), fluoreno (F), fenantreno (Phe), antraceno (Ant), fluoranteno (Flu), pireno (Pyr), criseno (Chry), benzo(b)fluoranteno (BbF), benzo(k)fluoranteno (BkF), benzo(a)pireno (BaP), benzo[ghi]perileno (BP), dibenz[a,h]antraceno (DBahA) and indeno[1,2,3-cd]pireno (IP).

Este sistema contiene una columna rellena de una cantidad de sorbente mínima necesaria para poder llevar a cabo la preconcentración de los analitos y realizar una elución con un volumen de disolvente orgánico lo más reducido posible (350  $\mu\text{L}$ ) para obtener un factor de preconcentración elevado. Además, se ha llevado a cabo un estudio sobre las diferentes variables que pueden influir sobre la SPE de los analitos (naturaleza de sorbente, eluyente, pH, volumen de rotura, caudal de muestra y gas portador del eluyente).

Para determinar el material sorbente se llevó a cabo un estudio utilizando cinco materiales sorbentes diferentes (Oasis HLB, LiChrolut EN, Amberlita XAD-2, Amberlita XAD-4 y RP-C18), obteniéndose los mejores resultados con RP-C18 (gel de sílice en fase reversa con grupos octadecilo). A continuación, se estudió la cantidad óptima de material sorbente que era necesaria para la retención de los analitos en el Interval entre 20 y 120 mg, siendo 60 mg la cantidad de sorbente óptima.

La influencia del pH sobre los analitos y la retención en la columna se estudió en el intervalo de 1 a 10, usando HCl y NaOH para el ajuste, no observándose efecto alguno del pH sobre la retención de los PAHs en el sorbente.

A continuación, se estudió el disolvente orgánico ideal para eluir los analitos del material sorbente, resultando el acetonitrilo como el más eficiente frente al resto de disolventes estudiados. El volumen de eluyente fue estudiado utilizando bucles de una válvula de inyección con diferentes volúmenes al sistema, desde 50 hasta 450  $\mu\text{L}$ , siendo 350  $\mu\text{L}$  el volumen óptimo de elución, con menor volumen se producían fenómenos de *carry-over*.

Los caudales de muestra y eluyente fueron estudiados ya que podrían afectar a los fenómenos de adsorción. Para ello se estudió la eficiencia en un intervalo de 1 a 5  $\text{mL min}^{-1}$ , siendo 4  $\text{mL min}^{-1}$  el flujo adecuado para maximizar la eficiencia del proceso. Por último, se llevó a cabo el estudio del volumen de ruptura del sistema de SPE, es decir, el volumen máximo de muestra que se puede procesar sin que los analitos puedan eluirse por la misma muestra. Para ello, se realizó un estudio añadiendo 50 ng de cada analito en diferentes volúmenes (10 a 500 mL) de agua ultrapura. Se obtuvieron resultados de eficiencia de casi el 100% hasta un volumen de 350 mL, a partir del cual la eficacia en la retención de los PAHs disminuía, siendo finalmente elegido como volumen de muestra 200 mL.

El método propuesto fue validado en el laboratorio, obteniendo unos resultados analíticos satisfactorios con límites de detección entre 0.01 y 0.3  $\text{ng L}^{-1}$  para 200 mL de muestra de agua y con una linealidad favorable (coeficiente de correlación  $>0.995$ ). La precisión del método fue elevada con desviaciones estándar relativas inferiores al 7.5 %. Para estudiar la exactitud del

método se realizó un estudio de recuperación, consiguiéndose unos porcentajes entre el 86 y el 102 %.

De acuerdo al objetivo indicado en este Capítulo de la Memoria, el método se aplicó a la determinación de PAHs en diferentes tipos de muestras de agua (grifo, aguas urbanas, pozo, lago, río, piscina, mar y residuales). En la mayoría de las muestras analizadas se encontró alguno de los analitos objeto de estudio, excepto el benzo(k)fluoranteno. En las muestras de agua residual y agua marina la concentración encontrada de los PAHs fue superior a la que se encontró en las otras aguas medioambientales analizadas. No obstante, en ningún caso se superaron los límites establecidos por la legislación europea. Para las aguas residuales se llevó a cabo el estudio de la presencia de estos compuestos en los influentes y efluentes de cuatro plantas de depuración de aguas residuales procedentes de cuatro ciudades diferentes en las que se utiliza un tratamiento anaerobio para la eliminación de los contaminantes acuosos. En este tipo de muestras se realizó un estudio de la eficacia de los procesos de tratamiento de aguas residuales para la eliminación de PAHs. Se observó que las concentraciones de los analitos disminuían entre 6 y 8 en las muestras efluentes con respecto a los influentes de las cuatro EDARs objeto de estudio.

---







Andrés J. Rascón, Abdelmonaim Azzouz, Evaristo Ballesteros. Assessing polycyclic aromatic hydrocarbons in cereal-based foodstuffs by using a continuous solid-phase extraction system and gas chromatography–mass spectrometry. *Food Control*, Volume 92, 2018, Pages 92-100, ISSN 0956-7135.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.050>.

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos pueden estar presentes en los productos alimenticios elaborados a base de cereales debido a la deposición de estos contaminantes sobre ellos o bien sobre el agua que se utilice en su procesado. Además, pueden generarse PAHs en este tipo de alimentos cuando estos son procesados, en las etapas de secado o cocción debido a la descomposición térmica de la materia orgánica, o bien en la etapa de ahumado ya que el humo puede contener a este tipo contaminantes. Las cantidades de PAHs que se pueden encontrar en los alimentos elaborados a base de cereales depende de la temperatura alcanzada en el proceso de secado y en de cocción y de la fuente de energía utilizada para su calentamiento. En la Unión Europea y a través del decreto 835/2011 se ha regulado el límite máximo de estas sustancias que puede estar presente en este tipo de alimentos, y ha establecido un valor de  $1 \mu\text{g Kg}^{-1}$  como límite para el benzo(a)pireno y la misma concentración para la suma de benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno y criseno.

Una vez realizadas esas premisas y cuando se pretendan determinar estos compuestos en los alimentos objeto de estudio, es necesario utilizar métodos muy sensibles y selectivos, que sean capaces de cuantificar a PAHs a niveles de traza sin que interfiera en su determinación la presencia de otras sustancias presentes en estos alimentos. Por ello, en este Capítulo de la Memoria se ha pretendido como objetivo principal el desarrollo de un método basado en el uso de dos técnicas de preparación de muestra, como son la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) y la extracción en fase sólida (SPE). En el caso de la SPE se llevará a cabo en un sistema continuo de extracción previamente optimizado en el Capítulo II para la determinación de 16 hidrocarburos policíclicos aromáticos. La combinación de UAE con el sistema SPE nos permite una eliminación eficiente de las interferencias que están presentes en la matriz de las muestras, en este caso cereales y alimentos derivados de éstos, con porcentajes de recuperación cercanos al 100 %.

Para ello, se llevó a cabo un estudio exhaustivo de las diferentes variables que pudieran afectar a la extracción asistida por ultrasonidos para este tipo de muestras (naturaleza y volumen del extractante, tiempo de extracción). Además, se optimizaron las variables que pudieran afectar a la centrifugación de la muestra tratada mediante (UAE), y el efecto de disolventes orgánicos utilizados para este tipo de extracción que pueden producir sobre la retención de los analitos en la columna sorbente del sistema continuo de SPE. En el caso de naturaleza y volumen de extractante, se obtuvieron los mejores rendimientos cuando la extracción se llevaba a cabo con *n*-hexano y con un volumen de 10 mL. También se estudió el tiempo de extracción, resultando que el tiempo óptimo de extracción es 5 minutos, a partir del cual la eficacia de la extracción no se veía incrementada.

A continuación, las muestras se centrifugaron con objeto de precipitar los sólidos que hay en suspensión y mejorar la interfase entre la muestra y el extractante. Para ello se optimizaron las variables que podían afectar a ésta, como fueron el tiempo de centrifugado, la temperatura y las revoluciones en la centrifugación, obteniéndose los mejores resultados a 4 °C, 5 minutos y 5 000 rpm, respectivamente. Posteriormente los extractos se llevaron a sequedad bajo una corriente de nitrógeno y se procedió a su redisolución. Para ello se probaron diferentes volúmenes de agua, pero no se llevaba a cabo una redisolución completa de los analitos diana. Por ello, se recurrió a la redisolución con una mezcla de agua:acetonitrilo, consiguiéndose con un volumen de 25 mL de agua al 4 % (v/v) en acetonitrilo la redisolución cuantitativa de los 16 PAHs.

La presencia de disolvente orgánico (acetonitrilo) en la fase acuosa que contiene a los PAHs podría afectar a la retención de éstos en la columna del sistema continuo de SPE. Por ello se hizo necesario el estudio de este efecto, mediante la realización de diferentes ensayos con disoluciones acuosas de analitos objeto de estudio y que contenían hasta un 30 % que se pasaron a través del sistema continuo de SPE. De estos estudios se concluyó que hasta un porcentaje de 15 % de acetonitrilo la eficacia en la retención de los PAHs era máxima. Este porcentaje de acetonitrilo en agua es superior al 4 % que se requería para la redisolución de la muestra.

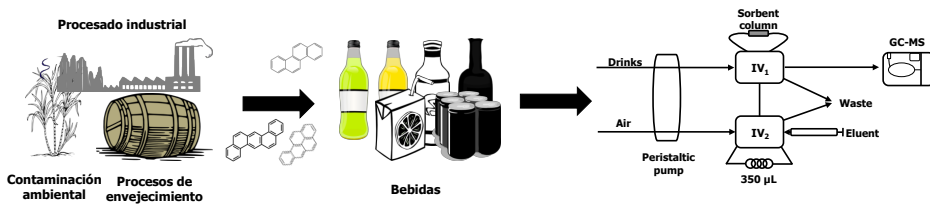
El método desarrollado posee un intervalo lineal satisfactorio para la determinación de los 16 PAHs entre 8 y 40 000 ng Kg<sup>-1</sup>. Además la sensibilidad del método es aceptable, con límites de detección entre 2 y 60 ng Kg<sup>-1</sup>, menores que los conseguidos en otras metodologías incluidas en la bibliografía. La precisión del método es satisfactoria, con una desviación estándar relativa menor del 7.5 %. Por último, se llevó a cabo un estudio de recuperación mediante la adición de 250, 1000 and 1500 ng kg<sup>-1</sup> a las diferentes tipos de muestras de alimentos elaborados a base de cereales, consiguiéndose porcentajes de recuperación próximos al 100 %.

Con estas premisas el método fue aplicado en la determinación de 16 PAHs en 22 muestras diferentes de alimentos elaborados en base a cereales, tales como harinas, galletas, pasta,

cereales de desayuno, arroces y panes. La mayoría de las muestras analizadas contenían naftaleno y antraceno a concentraciones comprendidas entre 13 y 5 500 ng Kg<sup>-1</sup>. Tres de las muestras de cereales analizadas y una de pan excedían el límite establecido de 1 µg Kg<sup>-1</sup> en el Reglamento UE 835/2011 para la suma de benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno y criseno (PAH4). Además, se realizó un estudio de como influía el proceso de tostación en el pan sobre el incremento de la presencia de este tipo de contaminantes. Se comprobó que los niveles de PAHs aumentaban cuando el pan se tostaba, encontrándose niveles del sumatorio PAH4 por encima de los límites permitidos en la Unión Europea.

---





#### **IV. Utilización de un sistema continuo para la extracción en fase sólida y de la combinación de la cromatografía de gases y espectrometría de masas para la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos en bebidas alcohólicas y no alcohólicas**



Rascón, A.J., Azzouz, A. and Ballesteros, E. (2019), Use of semi-automated continuous solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in alcoholic and non-alcoholic drinks from Andalucía (Spain). *J. Sci. Food Agric.*, 99: 1117-1125.

<https://doi.org/10.1002/jsfa.9279>

La presencia de los hidrocarburos policíclicos aromáticos en determinados grupos de alimentos depende de diversos factores, exposición medioambiental, ingredientes y tratamientos para su fabricación y almacenaje, entre otros. En este sentido, un número elevado de estudios de investigación han demostrado la presencia de los PAHs en diferentes tipos de bebidas, como té, café, bebidas destiladas, cerveza, refrescos, zumos de frutas y vino. Su presencia depende de las materias primas utilizadas, la forma en que se procesan industrialmente estas bebidas y de su exposición a la contaminación ambiental. Por ejemplo, para la producción de vino, vinagre y algunas bebidas destiladas se necesita el envejecimiento por almacenamiento en barriles de madera o en tanques de acero que contienen astillas de madera. La madera en barriles suele estar expuesta a la intemperie durante 1-3 años, y posteriormente se tuesta el roble mediante llama o bien mediante calentamiento convectivo, eléctrico o por infrarrojos, lo que puede generar unos niveles elevados de PAHs. Por otro lado, el secado y el tostado de la cebada a menudo conducen a la presencia de PAH en las bebidas elaboradas a base de cereales, como es la cerveza. Algunas bebidas destiladas, que incluyen el azúcar entre sus ingredientes iniciales, también pueden estar contaminadas con PAHs. Un ejemplo es la cachaça, bebida brasileña donde el azúcar proviene de cultivos donde se ha practicado la quema de rastrojos. También, otros ingredientes, tales como cereales, uvas, frutas y azúcar, usados para la producción de bebidas pueden contener este tipo de tóxicos por contaminación ambiental o bien debido a su presencia en los lubricantes usados en la maquinaria para su cosecha.

Por otro lado, el origen de los PAHs en los granos de café y en las hojas de té se puede deber a las etapas de secado y tostado de estas especies vegetales durante la producción de estas bebidas. En cambio, los zumos y algunos refrescos elaborados de frutas pueden estar contaminados por PAHs procedentes del Medio Ambiente, debido a que se pueden adherir fácilmente a la piel de la fruta. Este tipo de bebidas también contienen azúcar que durante el proceso de caramelización se han podido originar los contaminantes objeto de estudio en esta Memoria. Otra causa de la presencia de PAHs en los refrescos puede estar asociada a la adición de aceites comestibles, usados

como agentes estabilizadores o para evitar la turbidez, que hace que aumente significativamente la solubilidad de los PAHs en este tipo de bebidas.

En este Capítulo se ha desarrollado un método para la determinación de PAHs en diversos tipos de bebidas, tales como té, café, destilados, cervezas, refrescos, zumos y vinos. En la metodología propuesta, las muestras son tratadas en el sistema continuo de SPE optimizado en el Capítulo II de esta Memoria, en el cual se introducen directamente sin necesidad de realizar ninguna extracción previa.

Debido a la presencia de alcohol en muchas de las bebidas objeto de análisis, se vio la necesidad de realizar un estudio exhaustivo del efecto de la presencia de etanol sobre la eficacia de adsorción de los PAHs en la columna de SPE. Para ello, se prepararon disoluciones acuosas de los analitos que contenían porcentajes diferentes de etanol [5–30 % (v/v)] y se pasaron a través del sistema continuo de SPE, observándose que a partir de 20 % de contenido etanólico la eficacia de la adsorción disminuía. Por lo tanto, se seleccionó el 15 % como el valor límite de contenido alcohólico de las bebidas para que la adsorción de los analitos diana fuese cuantitativa. En el caso de análisis de muestras con un mayor porcentaje de alcohol, se debería de diluir para no superar ese límite.

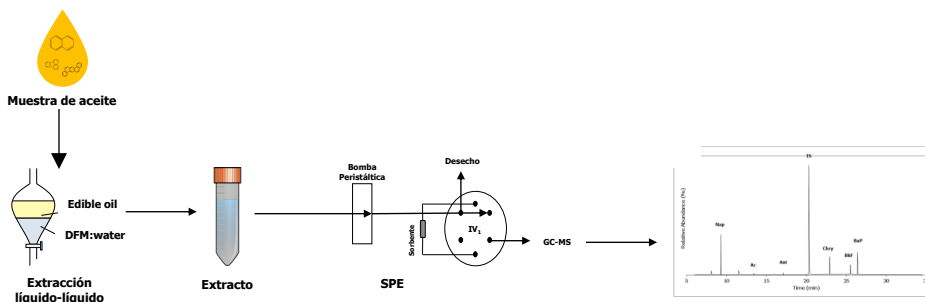
En el caso de algunas bebidas se requirió un pretratamiento sencillo de la muestra antes de su introducción en el sistema continuo. Por ejemplo, las muestras de vino fueron previamente decantados para evitar que partículas en suspensión pudieran obturar los tubos o válvulas del sistema continuo de SPE. En el caso de los zumos comerciales se filtraron a través de filtros de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  para evitar que la materia en suspensión pudiera obturar al sistema continuo. En el caso de las muestras de té y café se prepararon brebajes de estos alimentos. Para ello el brebaje de té se preparó mediante la pesada de 2 g por cada 100 mL de agua, y se mantuvo sumergido durante 5 minutos en el agua caliente, se filtró al vacío para eliminar la materia en suspensión y posteriormente se refrigeró antes de pasar por el sistema SPE. Las muestras de café se molieron en el laboratorio y se prepararon en una cafetera italiana clásica. Para ello, se tomaron 10 g de café por cada 100 mL de agua ultrapura, ajustándose el pH de las muestras a 4 para facilitar la eliminación de la fracción lipídica y precipitar los sólidos en suspensión presentes en el café. Después se llevó a cabo la centrifugación de las muestras para eliminar la materia suspendida de una manera más rápida y eficaz. En este sentido, se optimizaron las variables (revoluciones, tiempo y temperatura) que afectaban a la centrifugación, consiguiendo una separación eficaz de ambas fases cuando la centrifugación se llevaba a cabo a 5000 rpm durante 5 min y manteniendo la temperatura a 4 °C.

El método desarrollado provee un amplio intervalo lineal para los 16 PAHs (0.08–500 ng L<sup>-1</sup>) con un coeficiente de correlación superior a 0.995. La sensibilidad era satisfactoria, con límites

de detección entre 0.02 y 0.6 ng L<sup>-1</sup>. La precisión, expresada como RSD, comprendida entre 3.5 y 5.6 % (en el mismo día) o entre 4.1 y 6.5 % (en distintos días), y los porcentajes de recuperación para los diferentes analitos (90–103 %) demuestran la ventaja de la metodología desarrollada para el análisis de un número elevado de diferentes tipos de bebidas y que mejoran a los métodos encontrados en la bibliografía.

Este método ha sido aplicado en diferentes tipos de bebidas, tanto alcohólicas como no alcohólicas, tales como destilados (vodka, whisky, ron, ginebra), refrescos, té, café, vino y zumos. La mayoría de las muestras analizadas contenían alguno de los PAHs estudiados, salvo en una muestra de vino rojo y en otra de sidra. Los contaminantes que más frecuente se encontraron en las bebidas fueron el naftaleno, antraceno, fluoranteno y criseno con concentraciones entre 3.7 y 4900 ng L<sup>-1</sup>. Otros PAHs como el benzo(b)fluoranteno y el benzo(a)pireno se detectaron con frecuencia en las bebidas no alcohólicas analizadas. Todas las muestras de té y una de refresco contenían una concentración total de PAHs bastante elevada entre 3200 y 10800 ng L<sup>-1</sup>. No obstante, en ningún caso las concentraciones encontradas superaron el nivel máximo permitido en la legislación europea.





## V. Determinación multiresiduo de hidrocarburos policíclicos aromáticos en aceites comestibles mediante extracción líquido-líquido-extracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas



Andrés J. Rascón, Abdelmonaim Azzouz, Evaristo Ballesteros. Multiresidue determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils by liquid-liquid extraction–solid-phase extraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Food Control*, Volume 94, 2018, Pages 268-275, ISSN 0956-7135.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.015>.

Los aceites y grasas están muy presentes en la dieta, ya sea por su presencia en alimentos como ingrediente, para llevar a cabo el cocinado o simplemente por su ingesta directa. Los diferentes tipos de aceites existentes y los métodos de extracción y producción hace que el impacto y la presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos difiera mucho entre ellos. Por un lado, los frutos y semillas están expuestos a la contaminación ambiental. Por ejemplo, en el aceite de oliva virgen extra las aceitunas sólo pasan por un proceso de lavado externo con agua, en el que en muchas ocasiones las partículas que se han adherido a su superficie no son correctamente eliminadas y, por tanto, pasan al producto final al no poder realizarse ningún otro tratamiento. En el caso de aceites de oliva y aceites refinados, que pasan a través de procesos de desodorización y decoloración mediante diferentes técnicas, y en la que los PAHs pueden retenerse en los lechos de carbón activo o tierras de diatomeas, disminuyéndose significativamente el contenido de estos contaminantes. En los aceites provenientes de semillas se suma el hecho de que éstas son secadas para aumentar el rendimiento y eliminar la parte acuosa de las mismas, proceso que requiere que estas semillas estén expuesta a gases de combustión durante, pudiéndose originar PAHs. En el caso del refinado de este tipo de aceites se podría producir procesado similar al que ocurre con el aceite de oliva refinado, y eliminarse un elevado porcentaje de los PAHs que pudiera contener. Otros aceites como los de coco, etc. sufren procesos similares, los cuales afectan directamente la presencia de PAHs en el producto final.

Debido a las propiedades carcinogénicas y mutagénicas de estos compuestos, algunos organismos reguladores como la Agencia de Protección Ambiental (EPA), la Comisión Europea (CE) y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) han establecido niveles máximos permitidos para los PAHs en una amplia variedad de alimentos, y entre ellos los aceites comestibles. En Europa, el Reglamento (UE) No 835/2011 estableció un nivel máximo permitido de  $2 \mu\text{g Kg}^{-1}$  para el benzo(a)pireno y de  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  para la combinación de benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno y criseno (PAH4) en aceites y grasas, a excepción del aceite de coco que se estableció un límite para el sumatorio PAH4 de  $20 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .

Debido a que en el aceite generalmente los PAHs están presentes a niveles de traza, su determinación requiere el enriquecimiento previo del aceite mediante la extracción de los analitos diana. Para ello los investigadores han empleado diversas técnicas, tales como la extracción líquido-líquido (LLE), o la combinación de la LLE con la SPE o extracción asistida por microondas. La cromatografía de permeación en gel también ha sido utilizada en la bibliografía para separar los PAHs de las moléculas de lípidos presentes en las muestras de aceite y grasa. Otra técnica como es la microextracción en fase sólida ha sido utilizada para la extracción de PAHs presentes en aceites comestibles. Una vez los contaminantes son extraídos, éstos se determinan generalmente mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas o mediante cromatografía líquida de alta presión con detección fluorimétrica o por espectrometría de masas.

Una vez realizadas estas premisas, el objetivo de este Capítulo radica en la puesta a punto de un método para la determinación de PAHs en aceites comestibles mediante el uso de un sistema continuo de SPE y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. En la metodología desarrollada, se parte de una cantidad pequeña de muestra (0.5 g) y se disuelve en 5 mL de *n*-hexano. A continuación, se le añaden 10 mL de una mezcla de *N,N*-dimetilformamida:agua (9:1) para facilitar la extracción líquido-líquido de los PAHs. Después el extracto (2 mL min<sup>-1</sup>) se mezcla en el sistema continuo de SPE con un flujo agua ultrapura (5.0 mL min<sup>-1</sup>) para su dilución. Finalmente, la mezcla se pasa a través del material adsorbente de RP-C18 para la retención de los analitos. El proceso de SPE, concluye con la elución de los PAHs con acetonitrilo, y su posterior inyección en el GC-MS para su determinación.

Como es sabido, los aceites y grasas son sustancias que se caracterizan por su alta apolaridad, al igual que los PAHs, esto hace que la solubilidad de los analitos en este tipo de muestra sea muy elevada, lo cual dificulta la extracción de estos analitos con el uso de disolventes orgánicos. Como resultado, en este estudio se llevó a cabo el ensayo de una extracción líquido-líquido con diferentes disolventes y mezclas de ellos para aumentar la selectividad y poder eliminar de la manera más eficiente el efecto matriz. Una disolución de *N,N*-dimetilformamida (DMF) y agua nos permitía mantener la mayor parte de la materia grasa en la fase orgánica mientras que los PAHs eran aislados por dilución, ya que la presencia de agua en DMF alteraba sus coeficientes de reparto. Por ello, la proporción de DMF:agua fue estudiada en el intervalo entre 10:0 hasta 5:5 (v/v), siendo la proporción 9:1 la idónea para realizar una extracción satisfactoria de los PAHs presentes en la matriz del aceite. Por otro lado, se optimizó el volumen de extractante, consiguiéndose un rendimiento próximo al 100 % cuando se utilizaban 10 mL de la mezcla 9:1 DMF:agua.

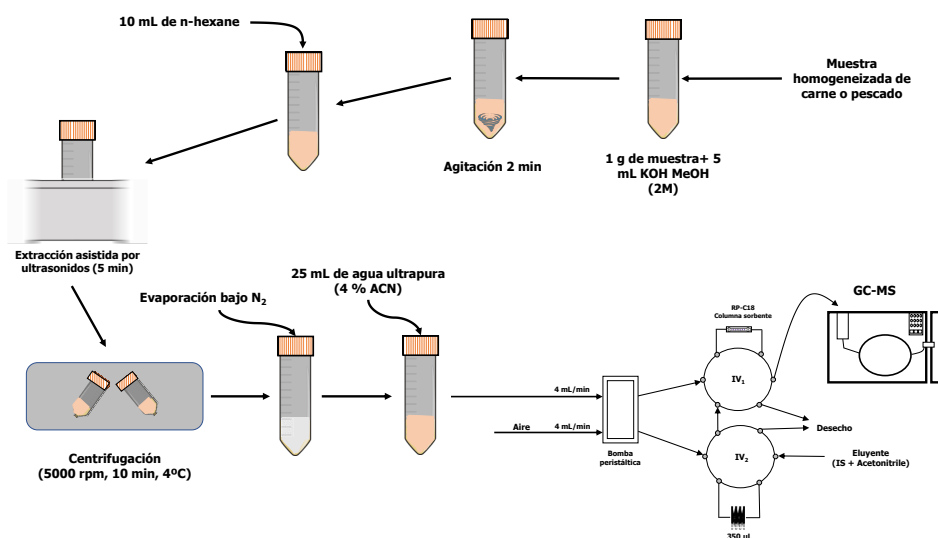
Finalmente se estudió el posible efecto de la presencia de DMF en la disolución sobre la adsorción de los PAHs en la columna de SPE incluida en el bucle de la válvula de inyección del sistema continuo. Para ello se prepararon diferentes disoluciones de 25 mL con proporciones

variables de DMF:agua y conteniendo todas la misma concentración de analitos. Se observó que cuando la proporción de DMF con respecto a la de agua era superior a la mitad, el porcentaje en la retención de los PAHs disminuía. Por lo tanto, los 10 mL del extracto procedente de la etapa de LLE se debe de diluir con 15 mL de agua ultrapura para no sobrepasar este límite de DMF presente en la disolución acuosa. Esta operación de dilución se facilita si se lleva a cabo mediante en el uso del sistema continuo. Para ello el extracto ( $2 \text{ ml min}^{-1}$ ) se diluye en continuo con una corriente de agua ultrapura a  $5 \text{ ml min}^{-1}$  antes de su paso por la columna rellena con el sorbente RP-C18.

El método propuesto presenta notables ventajas respecto a las propiedades analíticas básicas de la sensibilidad (límites de detección comprendidos entre 4 y  $110 \text{ ng Kg}^{-1}$ ), precisión (desviaciones estándares relativas inferiores al 7.5%) y exactitud (porcentajes de recuperación entre el 87 y el 104 %).

De acuerdo con el objetivo indicado en este Capítulo de la Memoria, el método se aplicó a la determinación de los 16 PAHs prioritarios en 31 muestras de aceite comestible de diferentes países, tales como aceite de oliva (virgen extra, virgen extra ecológico, virgen refinado, virgen frito), aceite de orujo de oliva, girasol (virgen, refinado y ahumado), aceite de sésamo, aceite de mezcla de semillas, aceite de coco virgen y aceite de soja. En todas las muestras analizadas se encontraron más de tres analitos diana, salvo en dos aceites refinados de girasol que no se detectó ningún PAH a la sensibilidad proporcionada por el método. Los contaminantes que más frecuentemente aparecieron en las muestras analizadas fueron naftaleno, antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno y benzo(a)pireno a niveles entre 16 y  $16500 \text{ ng Kg}^{-1}$ . Los aceites de oliva virgen extra no mostraron variaciones muy significativas de la presencia de PAHs, aunque su procedencia fuese muy diferente (España, Italia y Marruecos). En los aceites de oliva usados para freír apareció una elevada concentración de la mayoría de los analitos, con contenido total de PAHs alrededor de  $15000 \text{ ng Kg}^{-1}$  debido a las altas temperaturas a las que han sido sometidos y que han podido originar a los diferentes contaminantes debido a procesos pirolíticos del aceite y de los alimentos cocinados. También se ha encontrado un alto contenido en PAHs en los aceites de girasol ahumados usados para cocinar y ensaladas, con niveles globales de ellos entre 22000 y  $26000 \text{ ng Kg}^{-1}$ , por su contacto con humo procedente de madera. En los aceites de coco analizados se ha encontrado elevadas concentraciones de naftaleno, antraceno y benzo[ghi]perileno, debido posiblemente a contaminación ambiental, ya que son aceites vírgenes que no han sufrido ningún tratamiento químico. En ningún caso se superan los niveles máximos permitidos establecido por la legislación europea.





## VI. Determinación a nivel de traza de hidrocarburos policíclicos aromáticos en productos cárnicos y procedentes de la pesca mediante extracción asistida por ultrasonidos y extracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases-espectrometría de masas



Andrés J. Rascón, Abdelmonaim Azzouz, Evaristo Ballesteros, Trace level determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in raw and processed meat and fish products from European markets by GC-MS. *Food Control*, Volume 101, 2019, Pages 198-208, ISSN 0956-7135.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.037>.

La carne y el pescado son alimentos básicos en la dieta humana debido a que proporcionan unas cantidades suficientes de nutrientes. Según el último informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, el consumo de pescado por persona es de aproximadamente 20 kg año<sup>-1</sup>, siendo este promedio superior en los países industrializados (26.8 kg año<sup>-1</sup>). Las cifras de consumo de carne son marcadamente más altas, con un promedio mundial de 41.3 kg año<sup>-1</sup>, duplicándose en los países más desarrollados (95.7 kg año<sup>-1</sup>).

El origen de los hidrocarburos policíclicos aromáticos en la carne o el pescado se debe principalmente porque los animales se alimentan de plantas que han sido contaminadas por agua, tierra o aire. Sin embargo, estos contaminantes también pueden formarse por una combustión incompleta de la materia orgánica o bien debido al consumo de pienso que para su elaboración se han usado cereales que se han contaminado con los PAHs durante el proceso de secado. Estas sustancias tóxicas están presentes en los organismos marinos generalmente por contaminación de partículas en suspensión, derrames de petróleo y aceites de las industrias, o algunas prácticas de pesca. Además, los productos cárnicos y pescados pueden contaminarse de PAHs durante el procesamiento en el cocinado, bien a escala doméstica o industrial. Por ejemplo, los procedimientos de cocinado de asar a la parrilla, hervir, ahumar, secar y freír, son las principales fuentes de contaminación de la carne y los productos procedentes de la pesca. El uso de una llama directa sobre el producto y el goteo de grasa en el fuego caliente, mientras se asan estos productos a la barbacoa puede producir una gran cantidad de estos contaminantes que finalmente se adhieren a la superficie de la carne o del pescado. Otro proceso como es el ahumado de carne y pescado implica el contacto directo o indirecto de los volátiles (entre los que se encuentran los PAHs) generados durante la combustión de diversos tipos de materia orgánica (madera o carbón) y la comida. El "Código de prácticas para reducir la contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos en los alimentos elaborados con procedimientos de ahumado y secado directo" recomienda que se modifiquen las condiciones de cocinado de los alimentos con objeto de reducir la exposición a los PAHs.

La complejidad de las muestras de carne y pescado, y las bajas concentraciones a las que se pueden encontrar los PAHs en este tipo de matrices, implica la necesidad de una etapa de enriquecimiento de los analitos, además de procedimientos eficaces de extracción y limpieza para

evitar que interfieran la determinación de estos contaminantes. La mayoría de los métodos disponibles para este propósito están basados en el uso de procedimientos con muchas etapas que los hacen demasiado lentos y que estén expuestos a la contaminación externa y a las pérdidas de analitos. Dos de las opciones más utilizadas en la bibliografía son la extracción asistida por microondas (MAE), bien sola o en combinación con extracción en fase sólida. Algunos autores han incluido en el tratamiento de las muestras de carne y pescado una etapa de saponificación con una disolución alcalina en metanol o etanol previa a la etapa de extracción LLE o de limpieza mediante SPE. El objetivo que se ha planteado en este Capítulo de la Memoria radica en el desarrollo de un método sensible y fiable para la determinación de PAHs en carne y pescado que simplifique las etapas de tratamiento de muestra y que requiera un volumen mínimo de disolventes orgánicos. El método propuesto se basa en el uso de la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) en combinación con un sistema continuo de SPE para la determinación de los 16 PAHs prioritarios según la EPA mediante GC-MS. En primer lugar, la muestra es sometida a una digestión alcalina con objeto de eliminar el alto contenido lipídico y proteico de la matriz objeto de análisis. Para ello se partió de 1 g de muestra de carne o pescado y se mezcla con una disolución de NaOH en metanol. Se llevó a cabo la optimización de la concentración de la disolución de NaOH y su volumen necesaria para digerir los dos tipos de muestra, consiguiéndose una máxima eficacia para un volumen de 5 mL y una concentración de NaOH 2 M. A continuación se llevó a cabo la extracción asistida por ultrasonidos con n-hexano. El volumen óptimo de este disolvente fue estudiado para realizar una extracción cuantitativa de los analitos, obteniéndose una máxima eficacia para volúmenes superiores de 9 mL de n-hexano. Con objeto de separar de una manera efectiva la matriz de la muestra del extracto orgánico, se llevó a cabo la centrifugación de la mezcla. La máxima eficacia en la separación de ambas fases se consiguió cuando la centrifugación se llevaba a cabo a 5000 rpm durante 5 min, manteniendo la temperatura a 4 °C. Posteriormente los extractos se llevaron a sequedad con una corriente de nitrógeno y luego se procedió a su redisolución, con 25 mL de agua con un 4 % (v/v) de acetonitrilo. Para concluir con el tratamiento de muestra y con el objetivo de preconcentrar a los analitos y eliminar interferencias, el extracto redisoluelto se pasó por el sistema continuo de SPE optimizado en el Capítulo II de esta Memoria.

El método desarrollado posee un amplio intervalo lineal para los 16 PAHs (10–50 000 ng Kg<sup>-1</sup>). El método es muy sensible, con límites de detección entre 3 y 70 ng Kg<sup>-1</sup>, mejores que los que se han obtenido en otras metodologías incluidas en la bibliografía para productos cárnicos y los procedentes de la pesca. La precisión del método fue satisfactoria con desviaciones estándares relativas inferiores del 7.5 %. Finalmente se realizó un estudio de recuperación mediante la adición de 400, 800 and 1500 ng kg<sup>-1</sup> de cada PAH a los diferentes tipos de muestras estudiadas, consiguiéndose en todos los casos porcentajes de recuperación próximos al 100 %.

Con objeto de poder demostrar su aplicabilidad del método desarrollado, se analizaron diferentes tipos de productos cárnicos frescos (lomo de cerdo, muslo y pechuga de pollo, carne picada y filetes de ternera y cordero) y procesados (hamburguesa de ternera, hamburguesa de ternera a la parrilla, salchichas de cerdo, salchichas de pollo, salchichas de Frankfurt, roti de pollo, tocino ahumado, filete de ternera a la parrilla y chuleta de cerdo asado). Además, se analizaron diferentes tipos de pescado azul (salmón, trucha, pez espada, sardina y anchoa) y blanco (merluza, bacaladilla y lubina), así como otros tipos de alimentos de origen marino, como son anillas de calamar, gambas y mejillones. Por otro lado, y con objeto de estudiar cómo afecta el proceso de ahumado en los pescados, se estudiaron tres tipos de pescado ahumado (salmón, bacalao, palometa y arenque). De los análisis de las muestras que se llevaron a cabo se puede concluir que todos los alimentos contenían más de 6 PAHs, excepto en dos de ellas (muslo de pollo y merluza) donde no se encontró ninguno de los analitos diana a las concentraciones que el método podía detectar. Por otro lado, los contaminantes objeto de estudio estaban presentes a niveles especialmente altos en las muestras ahumadas (salchichas, salmón, palometa, bacalao y arenque), asadas (cerdo) y a la parrilla (hamburguesas y filete de ternera), con un contenido total de PAHs comprendido entre 8200 y 22900 ng Kg<sup>-1</sup>. La explicación del nivel tan elevado de PAHs encontrados en estas muestras se puede deber a que éstas se encontraban contaminadas con humo que contenía PAHs que se habían formado por una combustión incompleta durante el procesado del alimento. No obstante, en ninguno de los casos los PAHs presentes en las muestras analizadas superaron los niveles límite establecidos.



## **VII. Conclusiones**

---



## Conclusiones

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado diversas estrategias para el control de hidrocarburos policíclicos aromáticos en alimentos y aguas medioambientales. La mayoría de las metodologías existentes para cuantificación de los PAHs emplean las técnicas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas o bien la cromatografía líquida de alta eficacia con sistemas de detección fluorimétrica o bien espectrometría de masas. Sin embargo, debido a los niveles de traza que se encuentran estos contaminantes y a las matrices complejas de las muestras reales objeto de estudio, se hace necesaria una o varias etapas previas de preconcentración y eliminación de interferencias que suelen ser tediosas y requieren un elevado tiempo de análisis. La tendencia actual en la preparación de muestra se centra en la simplificación, la automatización y la miniaturización. En este contexto, las innovaciones del trabajo llevado a cabo en esta Memoria se han centrado en la automatización de las etapas de tratamiento de muestra, usando un sistema continuo de extracción en fase sólida para conseguir la preconcentración de los analitos y clean-up del extracto. En el caso de muestras muy complejas, como el caso de algunos alimentos, las muestras han tenido que ser pretratadas antes de su introducción en el sistema continuo de SPE, mediante el uso de la extracción asistida por ultrasonidos. A tenor de los resultados obtenidos durante el trabajo de investigación realizado en la presente Memoria, se pueden establecer una serie de conclusiones:

1. Se ha desarrollado un sistema continuo de extracción en fase sólida compuesto por una columna empaquetada con 60 mg del material sorbente RP-C18, con el que se consigue la retención de los 16 hidrocarburos policíclicos aromáticos desechando la matriz de la muestra que los contiene. El sistema nos permite la preconcentración de los analitos, realizando la elución de estos a un volumen reducido de 350  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo, obteniendo así unos factores de preconcentración elevados. Gracias a esto ha sido posible la determinación de los analitos diana a niveles por debajo de los límites máximos establecidos para las muestras agroalimentarias y ambientales.
2. Se han simplificado las etapas de pretratamiento de muestra mediante el uso de disolventes adecuados y técnicas de extracción asistida por ultrasonidos. Estas técnicas permitieron la eliminación cuantitativa de los componentes presentes en la matriz de la muestra y que pueden causar interferencias en las etapas de extracción en fase sólida, separación cromatográfica o detección mediante espectrometría de masas para los analitos de interés.

3. La combinación de la cromatografía de gases con la espectrometría de masas nos ha permitido la determinación simultánea de los 16 PAHs considerados como contaminantes prioritarios por la EPA y la Unión Europea (naftaleno, acenafileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo[ghi]perileno, dibenzo[a,h]antraceno, indeno[1,2,3-cd]pireno] en menos de 35 min, y con límites de detección inferiores a los conseguidos en las metodologías desarrolladas en la bibliografía y con unas. La precisión de los métodos desarrollados, expresada como desviación estándar relativa, es inferior al 7.5%.
4. Los estudios llevados a cabo mediante la aplicación de los métodos puestos a punto en esta Tesis han demostrado la presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos en muestras de aguas medioambientales y alimentos (cereales y derivados, aceites, bebidas alcohólicas y no alcohólicas, carne y pescado). La presencia de esta familia de compuestos en alimentos y aguas puede causar efectos negativos a la salud humana debido a su alto poder cancerígeno.
5. Los resultados derivados de los análisis de diferentes tipos de aguas ambientales aplicando la metodología desarrollada en esta Memoria se pueden indicar que son comparables a los que se han conseguido en otros estudios realizados en la bibliografía. Es destacable la presencia PAHs en las muestras de aguas ambientales, haciendo énfasis en la presencia de estos compuestos en las aguas marinas, principalmente debido a la contaminación por vertidos de petróleo y aceites. Además se ha puesto de manifiesto que las estaciones de depuración de aguas residuales consiguen eliminar entre 6 y 8 veces la concentración de los PAHs presentes en los influentes de estas plantas.
6. De la aplicación de los métodos desarrollados para la determinación de PAHs en alimentos se puede concluir que la mayoría de las muestras contenían más de tres analitos a niveles de  $\text{ng Kg}^{-1}$ . Habría que resaltar el alto contenido de los contaminantes encontrados en los alimentos cuando han sido cocinados en contacto con fuentes de calor, o bien ahumados, horneados o parrillados. Siendo destacable el ensayo que se realizó en el laboratorio para comprobar el efecto del tostado de pan en casa, demostrándose que se aumenta de una manera muy significativa la concentración de los PAHs, superando en la mayoría de los casos los niveles máximos permitidos.





---

# **VIII. Producción Científica de la Investigación**

---



## Artículos

**Título:** ASSESING POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN CEREAL-BASED FOODSTUFFS BY USING CONTINUOUS SOLID-PHASE EXTRACTION SYSTEM AND GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY.

**Revista:** Food Control

**Año:** 2018

**Volumen:** 92

**Página inicial:** 92

**Página final:** 100

**Autores:** Rascón, Andrés J.; Abdelmonaim Azzouz; Ballesteros, Evaristo.

**Título:** DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN ENVIRONMENTAL WATERS FROM SOUTHERN SPAIN BY USING A CONTINUOUS SOLID-PHASE EXTRACTION SYSTEM AND GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

**Revista:** Environmental Chemistry

**Autores:** Rascón, Andrés J.; Abdelmonaim Azzouz; Ballesteros, Evaristo.

**Título:** USE OF SEMI-AUTOMATED CONTINUOUS SOLID-PHASE EXTRACTION AND GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY FOR THE DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN ALCOHOLIC AND NON-ALCOHOLIC DRINKS FROM ANDALUCIA (SPAIN)

**Revista:** Journal of the Science of Food and Agriculture

**Autores:** Rascón, Andrés J.; Abdelmonaim Azzouz; Ballesteros, Evaristo.

**Título:** MULTIRESIDUE DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN EDIBLE OILS BY LIQUID-LIQUID EXTRACTION-SOLID-PHASE EXTRACTION-GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

**Revista:** Food Control

**Autores:** Rascón, Andrés J.; Abdelmonaim Azzouz; Ballesteros, Evaristo.

---

**Título:** TRACE LEVEL DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN MEAT AND FISH PRODUCTS BY ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION AND SEMI-AUTOMATED SOLID PHASE EXTRACTION COUPLED TO GAS CHROMATOGRAPHY–MASS SPECTROMETRY

**Revista:** Journal of Food Composition and Analysis

**Autores:** Rascón, Andrés J.; Abdelmonaim Azzouz; Ballesteros, Evaristo.

## **Aportaciones a Congresos**

**Título de la aportación:** SEMIAUTOMATED SOLID PHASE EXTRACTION SYSTEM COUPLED TO GAS CROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY FOR THE ISOLATION AND DETECTION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN CEREAL BASED FOODSTUFF

**Nombre del congreso:** XXI REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2017

**Lugar:** VALENCIA, ESPAÑA

**Autores:** Rascón, Andrés J.; Ballesteros, Evaristo.

**Título de la aportación:** POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS ISOLATION AND DETERMINATION FROM DRINK SAMPLES BY SOLID PHASE EXTRACTION ANALYTE ENRICHMENT AND GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

**Nombre del congreso:** XXI REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2017

**Lugar:** VALENCIA, ESPAÑA

**Autores:** Rascón, Andrés J.; García-Sánchez, Andrés; Ballesteros, Evaristo.

**Título de la aportación:** FULL AUTOMATION OF SOLID-PHASE EXTRACTION FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ENDOCRINE-DISRUPTING CHEMICALS IN BIOLOGICAL FLUIDS BY GAS CHROMATOGRAPHY - MASS SPECTROMETRY

**Nombre del congreso:** 1st International Congress on Multidisciplinary Health Research

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2016

**Lugar:** JAÉN, ESPAÑA

**Autores:** Abdelmonaim Azzouz; Rascón, Andrés J.; Ballesteros, Evaristo.

**Título de la aportación:** MULTIDETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS FROM FOOD AND BEVERAGE BY SOLID-PHASE EXTRACTION AND DETERMINATION BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

**Nombre del congreso:** 1ST INTERNATIONAL CONGRESS ON MULTIDISCIPLINARY HEALTH RESEARCH

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2016

**Lugar:** JAÉN, ESPAÑA

**Autores:** Rascón, Andrés J.; Abdelmonaim Azzouz; Ballesteros, Evaristo.

**Título de la aportación:** ISOLATION AND DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN CEREAL DERIVATE FOOD BY SOLID PHASE EXTRACTION AND GAS CHROMATOGRAPHY - MASS SPECTROMETRY

**Nombre del congreso:** JORNADAS DOCTORALES PARA JÓVENES INVESTIGADORES DE LA UNIVERSIDAD DE JAÉN

EDUJA 2016

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2017

**Lugar:** JAEN, ESPAÑA

**Autores:** Rascón, Andrés J.

**Título de la aportación:** ISOLATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS FROM INFUSION AND COFFEE BY SOLID-PHASE EXTRACTION AND DETERMINATION BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

**Nombre del congreso:** XX REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2015

**Lugar:** SANTIAGO DE COMPOSTELA, ESPAÑA

**Autores:** Rascón, Andrés J.; Abdelmonaim Azzouz; Ballesteros, Evaristo.

---

**Título de la aportación:** DETERMINATION OF ENDOCRINE DISRUPTING COMPOUNDS IN ENVIRONMENTAL SOLID SAMPLES BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY FOLLOWING MICROWAVE ASSISTED AND CONTINUOUS SOLID-PHASE EXTRACTION

**Nombre del congreso:** XX REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2015

**Lugar:** SANTIAGO DE COMPOSTELA, ESPAÑA

**Autores:** Abdelmonaim Azzouz; Rascón, Andrés J.; Ballesteros, Evaristo.

**Título de la aportación:** CONTINUOUS SOLID-PHASE EXTRACTION AND GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN ENVIRONMENTAL WATER SAMPLES

**Nombre del congreso:** XIV REUNIÓN DEL GRUPO REGIONAL ANDALUZ DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2014

**Lugar:** BAEZA, ESPAÑA

**Autores:** Rascón, Andrés J.; Abdelmonaim Azzouz; Ballesteros, Evaristo.

**Título de la aportación:** ISOLATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS FROM FOOD AND ENVIRONMENTAL WATER BY SOLID-PHASE EXTRACTION AND DETERMINATION BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

**Nombre del congreso:** I INTERNATIONAL MEETING OF YOUNG RESEARCHERS ON HERITAGE - PATRIMONIUN10

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2014

**Lugar:** BAEZA, ESPAÑA

**Autores:** Rascón, Andrés J.



