

Desarrollo de una
Metodología Analítica para
la Determinación de
Compuestos Aromáticos
Policíclicos en las
Fracciones $PM_{2.5}$ - PM_{10}
del Aerosol Atmosférico

A. I. Barrado

S. García

R. M. Pérez



Desarrollo de una
Metodología Analítica para
la Determinación de
Compuestos Aromáticos
Policíclicos en las
Fracciones $PM_{2.5}$ - PM_{10}
del Aerosol Atmosférico

A. I. Barrado
S. García
R. M. Pérez

Toda correspondencia en relación con este trabajo debe dirigirse al Servicio de Información y Documentación, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, Ciudad Universitaria, 28040-MADRID, ESPAÑA.

Las solicitudes de ejemplares deben dirigirse a este mismo Servicio.

Los descriptores se han seleccionado del Thesaurus del DOE para describir las materias que contiene este informe con vistas a su recuperación. La catalogación se ha hecho utilizando el documento DOE/TIC-4602 (Rev. 1) Descriptive Cataloguing On-Line, y la clasificación de acuerdo con el documento DOE/TIC.4584-R7 Subject Categories and Scope publicados por el Office of Scientific and Technical Information del Departamento de Energía de los Estados Unidos.

Se autoriza la reproducción de los resúmenes analíticos que aparecen en esta publicación.

Catálogo general de publicaciones oficiales
<http://www.060.es>

Depósito Legal: M -26385-2011
ISSN: 1135 - 9420
NIPO: 721-13-029-2

Editorial CIEMAT

CLASIFICACIÓN DOE Y DESCRIPTORES

S54

AROMATICS; POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS; FLUORESCENCE;
AIR POLLUTION MONITORING; SAMPLING

Desarrollo de una Metodología Analítica para la Determinación de Compuestos Aromáticos Policíclicos en las Fracciones PM_{2.5}-PM₁₀ del Aerosol Atmosférico.

Barrado, A. I.; García, S.; Pérez, R. M.
64 pp. 50 ref. 24 figs. 20 tablas

Resumen:

En este trabajo se presenta una metodología analítica optimizada y validada para la determinación de diversos compuestos aromáticos policíclicos en aire ambiente mediante cromatografía líquida con detección por fluorescencia. Este método de análisis se ha aplicado a muestras obtenidas durante más de un año en una zona de Madrid. Los compuestos seleccionados han incluido trece de los hidrocarburos policíclicos considerados como prioritarios por la EPA, y ciertos derivados hidroxilados, que han sido escasamente investigados en muestras de aire mediante cromatografía líquida con detector de fluorescencia.

Se han caracterizado y comparado intervalos de concentración de los compuestos identificados y estudiado las variaciones estacionales y mensuales. Además, se han aplicado las técnicas de análisis multivariante de estudio de correlaciones, análisis en factores y análisis clúster, para extraer la mayor cantidad posible de información para la interpretación y caracterización más completa y correcta de los resultados obtenidos y su relación con parámetros meteorológicos y físico-químicos.

Analytical Procedure Development to Determine Polycyclic Aromatic Compounds in the PM_{2.5}-PM₁₀ Fraction of Atmospheric Aerosols.

Barrado, A. I.; García, S.; Pérez, R. M.
64 pp. 50 ref. 24 figs. 20 tables

Abstract:

This paper presents an optimized and validated analytical methodology for the determination of various polycyclic aromatic compounds in ambient air using liquid chromatography with fluorescence detection. This analysis method was applied to samples obtained during more than one year in an area of Madrid. Selected compounds have included thirteen polycyclic hydrocarbons considered priorities by the EPA, and hydroxylated derivatives, which have been less investigated in air samples by liquid chromatography with fluorescence detection.

We have characterized and compared the concentration ranges of compounds identified and studied seasonal and monthly variations. In addition, the techniques have been applied to study multivariate correlations, factor analysis and cluster analysis to extract as much information as possible for interpretation and more complete and accurate characterization of the results and their relationship with meteorological parameters and physicochemical.

1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS Y DERIVADOS	
HIDROXILADOS.....	3
1.2 TÉCNICAS Y MÉTODOS DE ANÁLISIS UTILIZADOS	5
1.2.1 METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA EL MUESTREO	5
1.2.2 METODOLOGÍA DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS SÓLIDAS	8
1.2.2.1 Extracción continua en soxhlet.....	8
1.2.2.2 Extracción asistida por ultrasonidos	9
1.2.2.3 Extracción asistida por microondas.....	10
1.2.3 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN	11
1.2.3.1 PAH's	11
1.2.3.2 OHPAH's.....	12
2. PARTE EXPERIMENTAL	13
2.1 PATRONES, DISOLVENTES E INSTRUMENTACIÓN.....	13
2.1.1 PATRONES COMERCIALES	13
2.1.2 GASES, DISOLVENTES Y MATERIAL DE MUESTREO.....	14
2.1.3 EQUIPOS	14
2.2 PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA Y ACONDICIONAMIENTO.....	15
2.2.1 LIMPIEZA Y ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL ANALITICO..	15
2.2.2 LIMPIEZA Y ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL DE MUESTREO	
.....	16
2.3 PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES ESTANDAR DE LOS	
ANALITOS DE INTERÉS	16
2.4 MUESTRAS ESTUDIADAS	17
2.4.1 MUESTREO.....	17
2.4.2 ANÁLISIS GRAVIMÉTRICO	19
2.5 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	19
2.5.1 ETAPA DE EXTRACCIÓN	19
2.5.2 PURIFICACIÓN O “CLEAN-UP” DEL EXTRACTO	21
2.6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y CONTROL DE CALIDAD	22
2.6.1 CONDICIONES DE OPERACIÓN	22
3. RESULTADOS.....	24
3.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	24
3.1.1 ETAPA DE EXTRACCIÓN	24
3.1.2 ETAPA DE PURIFICACIÓN O “CLEAN UP” DEL EXTRACTO	27
3.1.3 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	28
3.1.4 PARÁMETROS DE CALIDAD	30
3.1.4.1 Intervalos de linealidad	30
3.1.4.2 Sensibilidad y Límites de Detección.....	31
3.1.4.3 Validación de los métodos analíticos	34
3.1.5 APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS AMBIENTALES	37
3.2 CARACTERIZACIÓN ANUAL DE LOS COMPUESTOS ESTUDIADOS....	39

3.2.1 ANÁLISIS GRAVIMÉTRICO	39
3.2.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE INTERÉS EN LAS MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES	41
3.2.2.1 Fase particulada PM ₁₀	42
3.2.2.2 Fase particulada PM _{2.5}	48
3.2.3 RELACIÓN CONCENTRACIÓN MEDIDA DE MATERIAL PARTICULADO/PAC's EN ESTUDIO	52
4. CONCLUSIONES	53

INTRODUCCIÓN

1.1 HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS Y DERIVADOS HIDROXILADOS

Bajo la denominación de compuestos aromáticos policíclicos (PAC's) se engloba una familia de compuestos formados por la condensación de dos o más anillos aromáticos de 6 carbonos que originan diferentes estructuras químicas. Dentro de esta familia se incluyen los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH's), que son aquellos PAC's que solo contienen carbono e hidrógeno en su molécula (Harvey, 1997; Henner et al., 1997).

La condición más propicia para la formación de PAH's es la combustión incompleta de hidrocarburos a temperaturas relativamente elevadas (superiores a 500 °C) y con insuficiente oxígeno. Los PAH's sufren degradaciones, y diversas reacciones, como por ejemplo fotoquímicas, con otros contaminantes gaseosos, etc. (Kakimoto et al., 2001; Mallakin et al., 2000; Miet et al., 2009; Zhang et al., 2011) dando lugar a PAH's sustituidos (Figura 1.1).

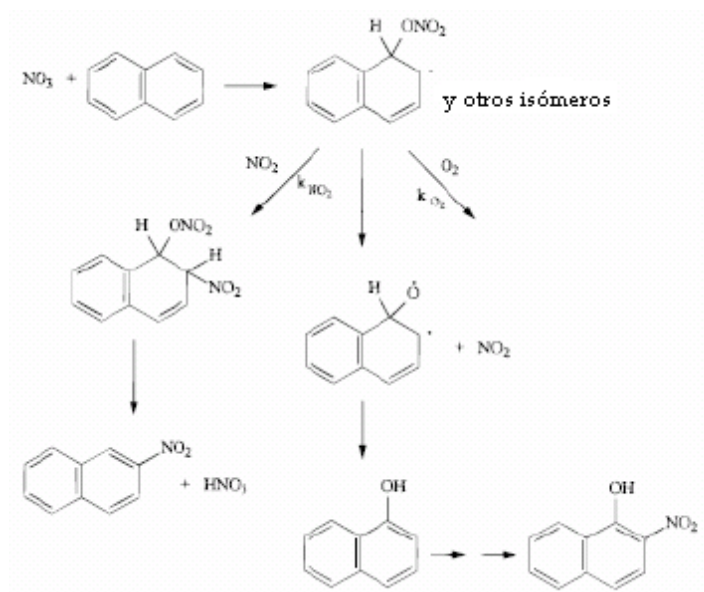


Figura 1.1. Formación y origen de los derivados hidroxilados

El interés en conocer sus niveles ambientales radica, fundamentalmente, en las propiedades carcinógenas, mutágenas, y teratógenas que poseen algunos de los compuestos, lo que los llevó a ser considerados como contaminantes prioritarios por la Agencia Norteamericana de Protección del Medioambiente (US-EPA) y la Unión Europea (Harvey, 1997; IARC, 1983, 2008; Neilson).

Los PAH's son emitidos principalmente a la **atmósfera**, donde pueden ser transportados en la fase vapor y adsorbidos en la materia particulada. La distribución entre aire y materia particulada, bajo condiciones atmosféricas normales, depende de su lipofilia, presión de vapor y solubilidad acuosa de la sustancia. Los compuestos más volátiles, con dos o tres anillos aromáticos, son emitidos a la fase gaseosa, mientras que entre el 80-100% de los PAH's con 5 o más anillos se encuentran asociados a partículas atmosféricas.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos hidroxilados (OHPAH's) se usan comúnmente para determinar la exposición humana frente a los PAH's presentes en la atmósfera (Jongeneelen et al., 1988a; Jongeneelen et al., 1986; Jongeneelen et al., 1988b; Mattarozzi et al., 2009). Estos penetran en el cuerpo humano a través de las rutas respiratoria, gastrointestinal y dérmica, y una vez en el interior del organismo, el hígado y otros tejidos metabólicamente activos los transforman en otros compuestos más fácilmente eliminables en orina, entre los que destacan los monohidroxi y dihidroxiderivados. Los OHPAH's pueden actuar como receptores estrogénicos y poseen actividad estrogénica y anti-estrogénica, además muestran una mayor citotoxicidad que sus parientes PAH's.

Los OHPAH's son emitidos directamente a la atmósfera por procesos de combustión incompleta, y también como resultado de reacciones atmosféricas tras la oxidación de los correspondientes PAH's con radicales hidroxilo (Atkinson et al., 1987; Atkinson et al., 1983). Estos procesos pueden tener lugar tanto en la fase gaseosa como en la particulada, predominando durante el día las reacciones con radicales OH y durante la noche con NO₃.

Tabla 1.1. Concentraciones de OHPAH's medidas en diferentes ciudades

OHPAH's	Concentración	Procedencia
2-hidroxifluoreno	Ver. 3.8 pg.m ⁻³ Invier. 48.6 pg.m ⁻³	Tokio (Japón) (Kishikawa et al., 2004)
1-hidroxipireno	Ver. 6.0 pg.m ⁻³ Invier. .63.3 pg.m ⁻³	Tokio (Japón) (Kishikawa et al., 2004)
10 OHPAH's	Total ver. 78pg.m ⁻³ Total invier. 214 pg m ⁻³	Nanjing (China) (Wang et al., 2007)
2-hidroxi 9-fluorenona	Ver. 5 pg.m ⁻³ Invier. 75pg.m ⁻³	Barcelona (España) (Galceran and Moyano, 1995; Galceran et al., 1995)

En general las concentraciones halladas en la bibliografía para los derivados hidroxilados son de 1 a 3 órdenes de magnitud menores que las medidas para los PAH's

precursores. Como se observa en la Tabla 1.1, las concentraciones en invierno son bastante más abundantes que en verano, lo que probablemente es un resultado de los mayores niveles encontrados en los PAH's de origen. Esta diferencia entre estaciones también se debe a la menor estabilidad de los derivados hidroxilados, siendo bastante más fácilmente degradables cuando las temperaturas ambientales son elevadas(Wang et al., 2007; Wang et al., 2010).

1.2 TÉCNICAS Y MÉTODOS DE ANÁLISIS UTILIZADOS

En general, cualquier método analítico se inicia con la toma de muestras. En el caso de los compuestos de interés en este trabajo, las necesidades generales del muestreo en aire ambiente incluyen:

- Medios de muestreo compatibles con los métodos de análisis.
- Volúmenes de aire muestreado estables y que proporcionen el suficiente depósito para los análisis pertinentes sin que se produzca sobrecarga de los medios de muestreo.
- Superficies de muestreo que no reaccionen con las especies medidas.
- Procedimientos de operación de muestreo prácticos, efectivos y útiles.

Los métodos de análisis requieren, además de una alta capacidad de resolución, una elevada selectividad del detector para cuantificar estos compuestos en dichas muestras. Es habitual incluir tres etapas en el procedimiento de análisis para la determinación de este tipo de compuestos:

- (1) Extracción y aislamiento de los compuestos de interés de la matriz de la muestra,
- (2) Limpieza de impurezas y de fraccionamiento en subgrupos,
- (3) Identificación y determinación cuantitativa de los componentes individuales de cada uno de estos subgrupos.

1.2.1 METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA EL MUESTREO

La metodología se elegirá en función de que las concentraciones sean de emisión o de inmisión. Para las primeras, se debe realizar el muestreo en el propio punto de emisión del contaminante, mientras que para las segundas, se debe realizar el muestreo en la zona en la

que se quiere evaluar el efecto del contaminante, pudiendo haber sido emitido por una o varias fuentes.

Muestreo en inmisiones

Los PAH's y sus derivados se pueden presentar tanto en la fase gaseosa como en la fase particulada, por lo tanto habrá dos tipos diferentes de muestreo.

Actualmente existen diversos equipos o captadores para llevar a cabo el muestreo de los compuestos semivolátiles en aire: muestreadores activos, pasivos, analizadores automáticos, sensores remotos, etc.

Los muestreadores activos son los más empleados debido a su simplicidad y bajo coste. Las características necesarias de estos equipos básicamente se reducen a que proporcionen un caudal suficientemente alto y que este caudal sea fiable y relativamente estable. Debido a estos elevados caudales estos equipos se denominan “captadores de alto volumen”.

Un captador de alto volumen para la recolección de partículas atmosféricas y vapores orgánicos mediante los filtros y los cartuchos convencionales se incluye en la Figura 1.2. Este equipo se caracteriza por su fácil manipulación, presentando un temporizador diario que permite variar los caudales de aire.



Figura 1.2.Captador de alto volumen, modelo PM-1025-CAV

Los filtros de fibra de vidrio y los cartuchos de espuma de poliuretano (PUFs) son los medios de retención de partículas y fase gaseosa, respectivamente, de uso más generalizado (García, 2000; Ras et al., 2009; Ravindra et al., 2006), porque presentan

numerosas ventajas, entre las que se encuentra su sencillo manejo, su bajo coste y que permiten alcanzar buenos caudales.

Muestreo del material particulado

El material particulado puede ser clasificado en función del tamaño de las partículas, naturaleza, origen o fuentes. La forma más eficaz de discernir entre el tamaño de partículas, es clasificarlas en función del diámetro aerodinámico. Así el PM_{10} , se define como las partículas atmosféricas con el diámetro aerodinámico inferior a $10\text{ }\mu\text{m}$, mientras que el $PM_{2.5}$ engloba a las partículas con diámetro aerodinámico inferior a $2.5\text{ }\mu\text{m}$, y el PM_1 a las partículas con diámetro aerodinámico inferior a $1\text{ }\mu\text{m}$. De especial interés son los aerosoles con diámetro igual o menor a $10\text{ }\mu\text{m}$, así como la materia particulada con diámetro menor a $2.5\text{ }\mu\text{m}$, ya que representan la fracción de partículas inhaladas en la región más profunda del tracto respiratorio, constituyendo un riesgo potencial para la salud y a su vez es donde se concentra la mayor cantidad de PAH's por condensación de la fase gaseosa en las partículas más pequeñas.

En función del cabezal escogido, estos captadores pueden recoger, por tanto, partículas con diámetros inferiores a un diámetro determinado. Estos captadores de alto volumen están formados por un soporte para el filtro de 15 cm , un sistema de aspiración con bomba centrífuga y sistema de medida y regulación del caudal comprendido entre $20\text{-}80\text{ m}^3\text{h}^{-1}$ controlado por un microprocesador. El soporte del filtro suele tener forma de tejado, con el fin de proteger éste de la acción del viento y la lluvia. El sistema de aspiración es capaz de producir un caudal constante entre 20 y $100\text{ m}^3\text{.h}^{-1}$.

El funcionamiento de estos cabezales se basa en dirigir el aire que penetra en el captador a una zona de fraccionamiento, que consta de nueve boquillas o toberas de aceleración. Las partículas de tamaño superior al seleccionado (PM_{10} , $PM_{2.5}$, PM_1) impactan en la plancha inferior, mientras que las de menor tamaño siguen en suspensión, canalizándose a través de otros 16 tubos y pasan a depositarse en un filtro. El diseño de las boquillas es determinante a la hora de discriminar las partículas por su tamaño, ya que la velocidad del fluido será función del diámetro y número de éstas. Se puede seleccionar la fracción muestreada con la instalación de distintos cabezales portafiltros (toberas de PM_{10} , de $PM_{2.5}$ y de PM_1).

En relación al tipo de filtros para la retención de la materia particulada, los de fibra de vidrio suelen ser de los más utilizados por su elevada capacidad de retención y su reducido coste. Están formados por entrecruzamientos tridimensionales de fibras con un diámetro de poro no definido, generalmente no reaccionan con los componentes de la muestra, pueden ser descontaminados a temperaturas elevadas y son frágiles de manipular.

Por último, cabe señalar la necesidad de realizar pretratamientos de acondicionamiento y limpieza para minimizar las posibles contaminaciones en los filtros de fibra de vidrio (García, 2000).

1.2.2 METODOLOGÍA DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS SÓLIDAS

Métodos muy comúnmente utilizados para la extracción de PAH's y sus derivados en una muestra con esta matriz incluyen extracción en soxhlet, ultrasonidos, microondas o las particiones con un disolvente adecuado o una mezcla de disolventes. Los disolventes más habituales son diclorometano, ciclohexano, benceno, metanol y mezclas de ellos.

1.2.2.1 Extracción continua en soxhlet

La extracción en soxhlet (SX) (Figura 1.3) es uno de los métodos estándar de extracción de muestras sólidas más utilizado desde su diseño en 1879; y actualmente es el principal método de referencia con el que se comparan otros métodos de extracción.

Esta técnica presenta ventajas, como por ejemplo que la muestra está en contacto repetidas veces con porciones frescas de disolvente, que no es necesaria la filtración después de la extracción y que se obtienen excelentes recuperaciones. Sin embargo, presenta también claras desventajas, como son un elevado consumo de disolventes, y el tiempo requerido para llevar a cabo la extracción (8-48 horas).



Figura 1.3. .Extractor Automático Soxhlet BÜCHI.

Existen innumerables aplicaciones en las que se utiliza la extracción soxhlet como técnica de preparación de muestras sólidas en la determinación de PAH's.

En la mayoría de ellas, la extracción se lleva a cabo con disolventes de baja polaridad, siendo el diclorometano uno de los más usados(Fidalgo-Used et al., 2007).

1.2.2.2 Extracción asistida por ultrasonidos

La extracción asistida por ultrasonidos (ultrasound-assisted solvent extraction, USE) (Figura 1.4) es otra técnica convencional, utilizada de manera habitual para la extracción de contaminantes en muestras sólidas.



Figura 1. 4. Baño de ultrasonidos

Las variables que afectan al sistema, y por lo tanto a la eficiencia de la extracción, son la frecuencia e intensidad de la vibración, tipo de disolvente, tiempo de extracción, temperatura y tamaño de partícula de la muestra.

Se trata de un método simple, que ofrece la posibilidad de realizar varias extracciones simultáneamente. Las extracciones pueden realizarse a temperaturas poco elevadas, por lo que es adecuada para la extracción de analitos térmicamente lábiles(Fidalgo-Used et al., 2007; Khan, 2005; Romanik et al., 2007). Entre los principales inconvenientes se encuentran el elevado consumo de disolvente, la necesidad de una etapa de centrifugación y/o filtración después de la extracción y que no es fácilmente automatizable(Ridgway et al., 2007).

Esta técnica se ha empleado mucho en la extracción de PAH's en muestras medioambientales, y en la mayoría de las aplicaciones se utiliza diclorometano como disolvente extractante.

1.2.2.3 Extracción asistida por microondas

La extracción asistida por microondas (microwave-assisted extraction, MAE) ha despertado un gran interés en el campo de la Química Analítica, ya que constituye una herramienta poderosa, que permite la extracción rápida y eficiente de analitos, desde matrices sólidas de elevada complejidad.

Por otro lado, la MAE (Figura 1.5) ofrece mejoras respecto a las técnicas de extracción convencionales, ya que ofrece la posibilidad de realizar la extracción simultánea de un elevado número de muestras, y además permite la reducción del tiempo de extracción y del consumo de disolvente, superando así las principales limitaciones de SX y USE (Fidalgo-Used et al., 2007; Liu et al., 2007; Oukebdane et al., ; Portet-Koltalo et al., 2008).

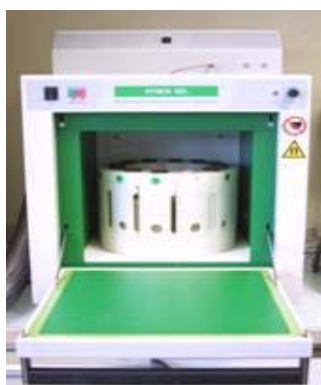


Figura 1. 5. Horno microondas multimodo

La naturaleza de la muestra y el disolvente, juegan un papel muy importante en el proceso de extracción. La correcta elección del disolvente es fundamental para obtener un proceso de extracción óptimo. En cuanto al volumen de disolvente, éste debe asegurar que toda la muestra esté inmersa en el mismo. La temperatura es el parámetro más investigado en MAE, puesto que es un factor que afecta de manera importante a la eficiencia de la extracción. Temperaturas superiores al punto de ebullición del disolvente mejoran la eficiencia de extracción, ya que favorecen la desorción de los analitos de los sitios activos de la matriz. Además, los disolventes incrementan su capacidad para solubilizar los analitos, al mismo tiempo que disminuye la tensión superficial y la viscosidad, favoreciendo la penetración del disolvente en la matriz.

El aumento del tiempo de extracción generalmente presenta un efecto positivo en el proceso. Sin embargo, esto no se traduce en tiempos de extracción infinitamente largos, ya

que a partir de cierto momento este parámetro deja de afectar al sistema. En el caso de compuestos termolábiles, tiempos de extracción prolongados favorecen la degradación.

1.2.3 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN

1.2.3.1 PAH's

Existen muchos métodos para determinar concentraciones de PAH's en muestras medioambientales (tanto a nivel traza, como concentraciones más mayores). De estos métodos los más empleados son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), ambas en combinación con varios detectores.

La HPLC ha sido una de las técnicas más empleadas para el análisis y determinación de PAH's en muestras medioambientales, ya que el desarrollo de una fase estacionaria no polar ha proporcionado una selectividad única en la separación de los isómeros de PAH's en las muestras. También es importante el papel que juega la temperatura, ya que en HPLC se trabaja prácticamente siempre a temperatura ambiente y compuestos que sean termolábiles se podrán analizar mejor con HPLC que con GC. En esta técnica los elevados pesos moleculares no resultan un problema(Liu et al., 2007).

La cromatografía en fase inversa, utilizando C₁₈ como fase estacionaria, es el método más habitual para llevar a cabo la separación y determinación de los PAH's. El principal requisito es que los compuestos se solubilizan en los disolventes utilizados como fase móvil.

Los sistemas de detección más habituales para llevar a cabo la determinación de los PAH's son, sin duda, fluorescencia y UV. Se trata de detectores no destructivos, por lo que existe la posibilidad de colocarlos en serie, y llevar a cabo la determinación mediante dos vías, en una única inyección.

Los detectores de fluorescencia se caracterizan tanto por su elevada selectividad (pocas son las moléculas que exhiben fluorescencia, aunque el número aumenta por formación de derivados fluorescentes pre- o post-columna) como por su gran sensibilidad, por lo que resultan muy útiles en el análisis de compuestos a niveles traza. Por su parte los espectros UV ofrecen información muy útil a la hora de confirmar identidades.

1.2.3.2 OHPAH's

Diversos investigadores han tratado de determinar los OHPAH's en el material particulado mediante cromatografía de gases (GC) con detectores de espectrometría de masas (MS) (Galceran et al., 1995; Galceran et al., 2005; Mattarozzi et al., 2009; Romanoff et al., 2006; Wang et al., 2007) y de captura electrónica (ECD) (Galceran et al., 1995).

La cromatografía de gases requiere derivatización de los OHPAH's para convertirlos en compuestos volátiles (Mattarozzi et al., 2009; Romanoff et al., 2006). Esta derivatización produce complicaciones en el método analítico, ya que es susceptible de contaminación y pérdida de los analitos.

La HPLC-ECD es una técnica relativamente simple para llevar a cabo la determinación de estos compuestos, pero la sensibilidad del método no es suficiente para determinar los niveles traza de los OH-PAH's en el material particulado (Galceran and Moyano, 1995). El acoplamiento HPLC-FL suele ser muy sensible y selectivo, y generalmente no requieren una fase de derivatización previa, haciendo rápida esta técnica ciertamente simple (Jongeneelen et al., 1985; Kishikawa et al., 2004). Esta técnica es aplicada básicamente para la determinación de este tipo de compuestos en muestras de orina (Jongeneelen, 2001; Rossella et al., 2009; Zhou et al., 2009), sin embargo, es raramente aplicada en la determinación en muestras de aire ambiente.

1. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 PATRONES, DISOLVENTES E INSTRUMENTACIÓN

2.1.1 PATRONES COMERCIALES

Patrón de PAH's

PAH- MIX 9 US EPA 16

Naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno, indeno. Dr. Ehrenstorfer GMBH, 10 ppm ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) Acetonitrilo.

Patrones de OHPAH's

2-Hidroxifenantreno. Dr. Ehrenstorfer GmbH, 10 ppm Acetonitrilo.

1-Hidroxipireno. Dr. Ehrenstorfer GmbH, 10 ppm Acetonitrilo.

Los **materiales de referencia** usados para validar los métodos de análisis fueron preparados como Material de Referencia (SRM, según acrónimo inglés) por el National Institute of Standards and Technology (NIST, USA). Principalmente, se emplearon dos tipos de material de referencia:

- **Material particulado diésel**, recogido mediante un sistema de filtración diseñado específicamente para la recolección de material diésel. Parte del material fue extraído para preparar SRM 1975 y el resto fue encapsulado para su distribución comercial como SRM 2975.
- **Material particulado urbano**, recogido en un área típicamente urbana. Mientras SRM 1649a (analizado en 2001) incluye solo concentraciones certificadas de 12 de los PAH's de interés en este trabajo.

2.1.2 GASES, DISOLVENTES Y MATERIAL DE MUESTREO

Gases:

- Gas nitrógeno 99.999 %.
- Aire pureza 99.999 %.

Disolventes:

- Acetonitrilo: Sigma-Aldrich 99.9%, Chromasolv, HPLC gradient.
- Diclorometano: Riedel-de Haën, 99.8%, Pestipur.
- Ciclohexano: Merck 99.5%.
- Metanol: Carlo Erba 99.85%, HPLC gradient.
- Hexano: Carlo Erba 96.5%, Pestipur.
- Acetona: Carlo Erba 99.8%, Pestipur.
- Ácido acético: Carlo Erba 99.8%.
- Agua desionizada: Milli Q, Millipore.

Material de muestreo:

Captador de alto volumen MCV con diferentes cabezales (PM_{2.5} y PM₁₀), y con sistema para:

Filtros de fibra de vidrio Whatman de 150 mm para la recogida de muestras en fase particulada PM_{2.5} y PM₁₀.

Cartuchos de espuma de poliuretano (PUF) para la recogida de las muestras en fase gaseosa. Tisch Environmental INC.

2.1.3 EQUIPOS

Equipos de muestreo:

Captador de alto volumen MCV, para la recolección de las muestras de aire en inmisiones y para la determinación de partículas en inmisión.

Los principales componentes de este equipo son:

- Módulo de muestreo, de dimensiones 900 x 580 x 600 mm y peso 20 Kg, el cual incluye dos soportes para la captación mediante filtro y adsorbente de espuma de poliuretano. Portafiltros PM-1025-CAV para filtros de 15 cm. de Ø (PM₁₀ o PM_{2.5}).

- Contenedor para adsorbentes de espuma de poliuretano, empleados en la retención de la fase gaseosa en aire ambiente.

- Regulador de voltaje, que modifica la velocidad hasta alcanzar el caudal deseado.

Caudal: regulable de 20 a 80 m³/h.

- Indicador del tiempo transcurrido.
- Bomba de aspiración.
- Programador de parámetros de muestreo, periodos y secuencias.

Equipo cromatográfico

El equipo cromatográfico empleado es un HPLC Agilent compuesto por:

- Bomba cuaternaria de Agilent serie 1200.
- Inyector automático Agilent 1100.
- Controlador de temperatura modelo Jones Chromatography 7971.
- Módulo de desgasificación.
- Detector de Ultravioleta-Visible Agilent 1050.
- Detector de Fluorescencia Agilent 1100.

Para la determinación de los PAH's se empleó una columna Supelcosil de C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm de tamaño de partícula).

Para la determinación de los compuestos NPAH's y OHPAH's se empleó una columna modelo Eclipse XDB-C18 (Agilent 150x 4.6 mm de 5 µm tamaño de partícula).

2.2 PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA Y ACONDICIONAMIENTO

2.2.1 LIMPIEZA Y ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL ANALITICO

El procedimiento de limpieza del material volumétrico empleado en este trabajo fue muy riguroso debido a los niveles traza característicos y la relativa facilidad de contaminación de este tipo de muestras. Se inició con el enjuague con diclorometano (DCM) y con el último disolvente empleado y siguió con lavado con agua y jabón, y aclarado final con agua destilada. Antes de emplear el material de vidrio, se enjuagó con el disolvente orgánico que se iba a emplear en cada caso.

El material de vidrio al que se ha aplicado este procedimiento de limpieza incluye columnas, viales, vasos de precipitados, pipetas, matraces y probetas.

También los equipos empleados fueron limpiados periódicamente: el SX utilizando DCM y dejándolo actuar durante un ciclo sin muestra, el microondas después de cada uso, lavando las vasijas con jabón y agua y posteriormente, haciéndolo funcionar sin muestra, sólo con 20 ml de DCM, durante un ciclo.

2.2.2 LIMPIEZA Y ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL DE MUESTREO

La etapa previa de acondicionamiento de filtros y cartuchos de espuma de poliuretano es muy importante. Así, los filtros de fibra de vidrio Whatman, utilizados para la recogida de la fracción particulada, fueron calcinados previamente en la mufla durante 24 horas a 400°C para eliminar cualquier resto de materia orgánica que estuviera presente. Después de la calcinación, los filtros son envueltos en papel de aluminio y almacenados bajo refrigeración a 4°C. Estos filtros se caracterizan por su robustez y tener baja retención de polvo, además de unas elevadas eficiencias de recolección a caudales relativamente bajos.

2.3 PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES ESTANDAR DE LOS ANALITOS DE INTERÉS

Las disoluciones patrón empleadas para los experimentos previos y para construir las curvas de calibrado fueron preparadas en el laboratorio por dilución de la disolución patrón madre a una concentración de 1 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ en el disolvente correspondiente, y a partir de ésta se prepararon las restantes.

Los PAH's analizados en este trabajo son naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, para la fracción particulada, y en la fracción gaseosa también se determinó el benzo(ghi)perileno.

En particular, los métodos de preparación de los patrones utilizados en los métodos de análisis de PAH's y OHPAH's estuvieron basados en una simple dilución de las disoluciones en acetonitrilo. Se prepararon calibrados con 6 ó 7 puntos con intervalos de concentración entre 5 y 500 $\text{ng}.\text{mL}^{-1}$, preparados a partir de una disolución de 1 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, que a su vez fue preparada de la disolución madre de 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Para una buena conservación de las muestras, los matraces se envolvieron en papel de aluminio, y se utilizaron viales ámbar de 1.5 mL. Las muestras y los patrones madre convenientemente etiquetados se mantuvieron en

el congelador (-18°C) hasta su análisis. Se evitaron períodos excesivamente largos de almacenamiento para evitar la degradación de los compuestos.

2.4 MUESTRAS ESTUDIADAS

2.4.1 MUESTREO

El muestreo se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas CIEMAT, a 7 Km. del centro de Madrid en la parte noroeste de la ciudad. El lugar se caracteriza por zonas abiertas, y puede ser considerada como zona semi-urbana. Esta zona también se caracteriza por estar cercana a la autovía A-6, carretera que tiene gran afluencia de tráfico.

Para muestrear se empleó un captador de alto volumen MCV (Figura 2.1).

Se recogieron dos tipos de muestras con distintos tamaños de partícula, $PM_{2.5}$ y PM_{10} . En particular, el muestreo se realizó durante un año completo, en dos días laborables consecutivos de la semana: uno para la fracción de $PM_{2.5}$ y el otro para la PM_{10} . La toma de muestras se efectuó en períodos de 24 horas, con caudales de $23 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ y volúmenes de muestreo de alrededor de 551 m^3 , los cuales permitieron recoger suficiente muestra para conseguir niveles mensurables de los compuestos de interés.



Figura 2.1. Captador de alto volumen.

Todas las muestras fueron debidamente clasificadas, conforme al día, tipo de muestra recogida, horas de inicio y finalización del muestreo, así como el volumen de aire recogido, caudal y observaciones o incidencias que ocurrieron el día del muestreo:

- Muestra
- Fecha
- Hora
- Pesada inicial (gramos)
- Pesada final (gramos)
- Totalizador del captador (m^3)
- Volumen aspirado (m^3)
- Caudal succionado ($\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$)
- Observaciones

El calendario del muestreo realizado se incluye en la Tabla 2.1.

Las muestras con fracción particulada fueron envueltas en papel de aluminio y almacenadas bajo refrigeración ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) para evitar cualquier tipo de contaminación.

Se recogieron datos atmosféricos de la estación de Isaac Peral (Plaza Cristo Rey acceso urgencias Hosp. Clínico, longitud $3^{\circ} 43' 0.16''$, latitud $40^{\circ} 26' 24.49''$, altitud 655 m), durante todo el periodo de muestreo, generando así una base datos para la posterior evaluación de la influencia de estos parámetros en los niveles de concentración de los PAH's y de los derivados investigados. Esta estación se encuentra a aproximadamente dos kilómetros de nuestro punto de muestreo.

Los parámetros físicos registrados fueron:

- Muestra (número de muestra y tipo)
- Fecha de la recogida (dd/mm/aa)
- Temperatura media del día($^{\circ}\text{C}$)
- Presión atmosférica (mb)
- Precipitación ($\text{l}\cdot\text{m}^{-2}$)
- Velocidad del viento ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)
- Dirección del viento (grados $^{\circ}$)
- Humedad relativa (%)
- Radiación solar ($\text{Med}\cdot\text{h}^{-1}$)

- Índice UVA

Los parámetros químicos registrados fueron:

- Partículas PM_{2.5} ($\mu\text{g.m}^{-3}$)
- Partículas PM₁₀ ($\mu\text{g.m}^{-3}$)
- Ozono ($\mu\text{g.m}^{-3}$)
- Óxido de nitrógeno ($\mu\text{g.m}^{-3}$)
- Dióxido de nitrógeno ($\mu\text{g.m}^{-3}$)
- Óxidos de nitrógeno totales ($\mu\text{g.m}^{-3}$)
- Dióxido de azufre ($\mu\text{g.m}^{-3}$)

2.4.2 ANÁLISIS GRAVIMÉTRICO

La determinación de la masa total de materia particulada en aire se calculó por diferencia de pesada antes y después de la toma de muestra en los filtros. Conociendo el volumen de aire muestreado se calculó la concentración total de partículas atmosféricas. Una vez determinada la diferencia de masas, las muestras permanecieron envueltas en papel de aluminio y bajo refrigeración (4°C) hasta su análisis.

2.5 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El filtro cargado se dividió en dos mitades que fueron pesadas, una de ellas se empleó para el estudio de PAH's y la otra mitad para el estudio de los OHPAH's. El tratamiento analítico se dividió en tres etapas: extracción, clean-up y determinación mediante HPLC-Fl.

Las eficacias de los procesos de extracción, purificación y derivatización se estudiaron por adición de una disolución patrón a los filtros, calculando los correspondientes rendimientos de extracción.

2.5.1 ETAPA DE EXTRACCIÓN

La optimización de esta etapa consistió en evaluar las recuperaciones obtenidas comparando tres métodos de extracción para los PAH's y sus derivados: SX, USE, y MAE, con distintos disolventes y mezclas. Para ello, se llevaron a cabo un mínimo de 5 ensayos, marcando los filtros con una disolución patrón de concentración conocida de los compuestos de interés y posteriormente procediendo al cuarteo de los filtros.

Tabla 2.1. Calendario anual de muestreo

PM 10							PM2.5													
Enero (2008)							Febrero (2008)							Marzo (2008)						
L	M	X	J	V	S	D	L	M	X	J	V	S	D	L	M	X	J	V	S	D
	1	2	3	4	5	6					1	2	3						1	2
7	8	9	10	11	12	13	4	5	6	7	8	9	10	3	4	5	6	7	8	9
14	15	16	17	18	19	20	11	12	13	14	15	16	17	10	11	12	13	14	15	16
21	22	23	24	25	26	27	18	19	20	21	22	23	24	17	18	19	20	21	22	23
28	29	30	31				25	26	27	28	29			24	25	26	27	28	29	30
														31						
Abril (2008)							Mayo (2008)							Junio (2008)						
L	M	X	J	V	S	D	L	M	X	J	V	S	D	L	M	X	J	V	S	D
	1	2	3	4	5	6				1	2	3	4							1
7	8	9	10	11	12	13	5	6	7	8	9	10	11	2	3	4	5	6	7	8
14	15	16	17	18	19	20	12	13	14	15	16	17	18	9	10	11	12	13	14	15
21	22	23	24	25	26	27	19	20	21	22	23	24	25	16	17	18	19	20	21	22
28	29	30					26	27	28	29	30	31		23	24	25	26	27	28	29
														30						
Julio (2008)							Agosto (2008)							Septiembre (2008)						
L	M	X	J	V	S	D	L	M	X	J	V	S	D	L	M	X	J	V	S	D
	1	2	3	4	5	6					1	2	3	1	2	3	4	5	6	7
7	8	9	10	11	12	13	4	5	6	7	8	9	10	8	9	10	11	12	13	14
14	15	16	17	18	19	20	11	12	13	14	15	16	17	15	16	17	18	19	20	21
21	22	23	24	25	26	27	18	19	20	21	22	23	24	22	23	24	25	26	27	28
28	29	30	31				25	26	27	28	29	30	31	29	30					
Octubre (2008)							Noviembre (2008)							Diciembre (2008)						
L	M	X	J	V	S	D	L	M	X	J	V	S	D	L	M	X	J	V	S	D
		1	2	3	4	5						1	2	1	2	3	4	5	6	7
6	7	8	9	10	11	12	3	4	5	6	7	8	9	8	9	10	11	12	13	14
13	14	15	16	17	18	19	10	11	12	13	14	15	16	15	16	17	18	19	20	21
20	21	22	23	24	25	26	17	18	19	20	21	22	23	22	23	24	25	26	27	28
27	28	29	30	31			24	25	26	27	28	29	30	29	30	31	1	2	3	4
Enero (2009)							Febrero (2009)							Marzo (2009)						
L	M	X	J	V	S	D	L	M	X	J	V	S	D	L	M	X	J	V	S	D
			1	2	3	4							1							1
5	6	7	8	9	10	11	2	3	4	5	6	7	8	2	3	4	5	6	7	8
12	13	14	15	16	17	18	9	10	11	12	13	14	15	9	10	11	12	13	14	15
19	20	21	22	23	24	25	16	17	18	19	20	21	22	16	17	18	19	20	21	22
26	27	28	29	30	31		23	24	25	26	27	28		23	24	25	26	27	28	29
														30	31					

Los disolventes utilizados para la optimización de la etapa de extracción fueron diclorometano, hexano, acetona, metanol y diferentes mezclas de ellos. Además se optimizaron otros parámetros como tiempo, temperatura y número de re-extracciones.

Se realizaron 8 análisis para estudiar los rendimientos de extracción de cada familia de compuestos investigada y empleando las tres técnicas seleccionadas

- Extracción SX: El procedimiento se llevó a cabo colocando en el extractor automático Büchi los filtros previamente marcados y debidamente cuarteados en los cartuchos de extracción de celulosa 35x80 mm Whatman (previamente limpios y acondicionados). Los compuestos se extrajeron con aproximadamente 150 mL del disolvente o mezcla de

disolventes seleccionada durante 8 horas aproximadamente. La temperatura de extracción seleccionada varió en función del disolvente empleado.

- Extracción USE: Se realizó con filtros previamente marcados con patrones (50 ppb) y cuarteados, con 10 mL de disolvente en cada extracción, y un tiempo de extracción de 15 minutos. Se realizaron extracciones consecutivas utilizando disolvente limpio con el objetivo de evaluar la efectividad de la extracción. Los tubos roscados empleados fueron envueltos con papel de aluminio y sellados con teflón para evitar cualquier pérdida.

- Extracción MAE: El procedimiento a seguir fue el mismo que para los dos anteriores, marcando los filtros con disolución patrón (50 ng.mL⁻¹) y cuarteándolos para proceder a la extracción. El programa de temperaturas incluyó un incremento de temperatura desde la ambiental hasta los 120°C en diez minutos y manteniendo esta temperatura durante los 20 minutos restantes. El tiempo total del método fue de 30 minutos, con 10 minutos posteriores para dejarlo enfriar.

2.5.2 PURIFICACIÓN O “CLEAN-UP” DEL EXTRACTO

Los ensayos de “clean-up” se llevaron a cabo con patrones de los compuestos, un mínimo de cuatro experimentos, y siguiendo el protocolo convencional de fraccionamiento mediante extracción en fase sólida con columna abierta. Para ello, se emplearon columnas de 10 x 1 cm rellenas con 1 g de gel de sílice, previamente acondicionada, y siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación:

El gel de sílice se sometió a un proceso previo de activación-desactivación mediante lavado durante 24 horas con DCM en un dispositivo Soxhlet convencional. Posteriormente se procedió a su activación durante 1 hora en la estufa a 200 °C, con el fin de eliminar cualquier resto de agua. A continuación, la sílice se pesó, y se procedió a su desactivación parcial mediante la adición del 5 % de su peso en agua.

1. El gel de sílice se pesó rápidamente, y se llevó a la columna de vidrio, previamente taponada con lana de vidrio, material inerte que actúa de soporte para la sílice. Para evitar posibles alteraciones del adsorbente, las columnas se van preparando de una en una, inmediatamente después de haber pesado la sílice.

2. Una vez compactada la columna para evitar la formación de vías, se acondicionó con 2 mL de hexano, y entonces se agregaron los patrones correspondientes en cabeza de columna.

3. Finalmente, la elución de la primera fracción, para la recuperación de los PAH's, se llevó a cabo tras la adición de 3 mL de hexano.

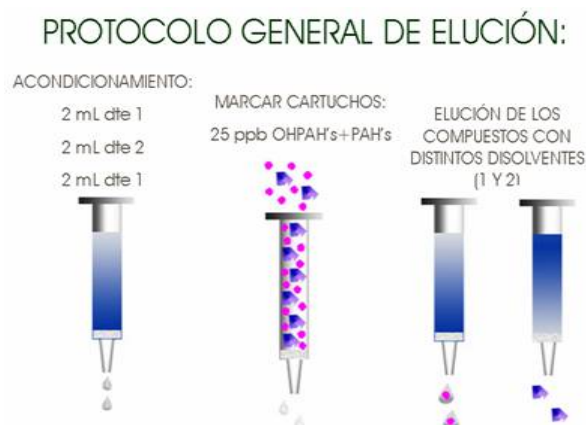


Figura 2.2. Protocolo de actuación para los MiniSpe-ed cartridges

Para llevar a cabo el clean up de los OHPAH's y de los PAH's también se probaron cartuchos comerciales SEP_PAK de C₁₈ y de sílice, también denominados Mini Spe-ed cartridges (Waters, Milford, MA, USA®). El volumen de estos cartuchos correspondió a 1.0 mL (Figura 2.2).

Para la elución de los compuestos más apolares se empleó hexano (disolvente I), mientras que para la de los más polares se utilizó DCM (disolvente II) y mezcla de éste con otros disolventes. Se realizaron 5 ensayos para cada familia.

2.6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y CONTROL DE CALIDAD

Parámetros cromatográficos como longitudes de onda para el análisis de cada compuesto, temperatura de la columna, volumen de inyección, composición de fases móviles y gradiente de disolventes, fueron estudiados durante la optimización experimental.

2.6.1 CONDICIONES DE OPERACIÓN

En el equipo cromatográfico es importante la revisión y limpieza regular del filtro de entrada de los disolventes es imprescindible para asegurar las mejores condiciones de operación instrumental.

Asimismo, el acondicionamiento previo y posterior del equipo cromatográfico es de gran interés para garantizar la reproducibilidad de los análisis y prolongar la vida media de la columna. La puesta en marcha del equipo requiere unos 15 minutos de estabilización con flujo de acetonitrilo y, al finalizar la jornada, conviene aplicar un programa de lavado consistente en dos ciclos, cuando se utilizan fases acuosas con modificadores de carácter ácido.

Ciclo 1: 15 minutos de lavado con 55% agua / 45% acetonitrilo con un caudal de 0.5 ml min⁻¹.

Ciclo 2: 20 minutos de lavado con 100% acetonitrilo con un caudal de 0.5 mL min⁻¹.

Esto es especialmente importante ya que los aditivos de carácter ácido o básico como el ácido acético empleado en este trabajo para el análisis de OHPAH's y NTPAH's pueden alterar la composición de la columna acortando en gran medida la vida media de la misma (Portet-Koltalo et al., 2008; Portet-Koltalo et al., 2009).

PAH's

Para estos compuestos los parámetros cromatográficos están muy estandarizados. La metodología inicialmente empleada para la determinación de PAH's fue la desarrollada previamente en nuestro laboratorio de cromatografía (García Alonso, 2007).

La columna empleada fue una Supelcosil C18 (LC-PAH 5 µm de espesor x 25 cm x 4.6 mm), la cual permitió obtener muy buena resolución en la identificación y determinación de los trece hidrocarburos aromáticos policíclicos de interés.

En particular, las condiciones experimentales incluyeron columna termostaticada a 36.9 °C, aplicando un caudal de 1,5 mL min⁻¹, y un volumen de inyección de 25 µL. El tiempo de análisis fue de 37 min

OHPAH's

Estos compuestos están muy poco citados en la bibliografía, por lo que la optimización de los distintos parámetros llevó implícito un trabajo bastante riguroso. Se hicieron análisis variando las condiciones y verificando cuales eran las óptimas para cada uno de los compuestos individualmente.

2. RESULTADOS.

3.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

3.1.1 ETAPA DE EXTRACCIÓN

Los mejores resultados y las condiciones en las que se obtuvieron se detallan a continuación:

Para los PAH's:

Ensayos preliminares realizados mediante extracción por ultrasonidos llevaron a los mejores rendimientos (n=10) empleando DCM como disolvente (Figura 3.1).

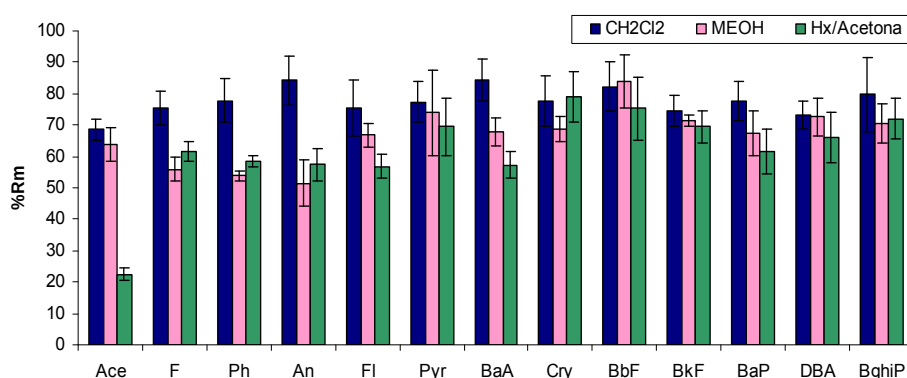


Figura 3. 1 Rendimientos obtenidos para PAH's empleando USE con diferentes disolventes

La Figura 3.2 muestra los rendimientos (n=10) obtenidos cuando se aplicaron las tres técnicas de extracción investigadas, empleando DCM como disolvente. Como era de esperar los mejores rendimientos se obtuvieron mediante extracción Soxhlet y extracción asistida con microondas. Esta última se realizó con un programa de 40 minutos, desde temperatura ambiente hasta alcanzar 120°C (900 V), aplicando un único ciclo. Ensayos realizados con una segunda re-extracción no indicaron un aumento significativo en los rendimientos alcanzados.

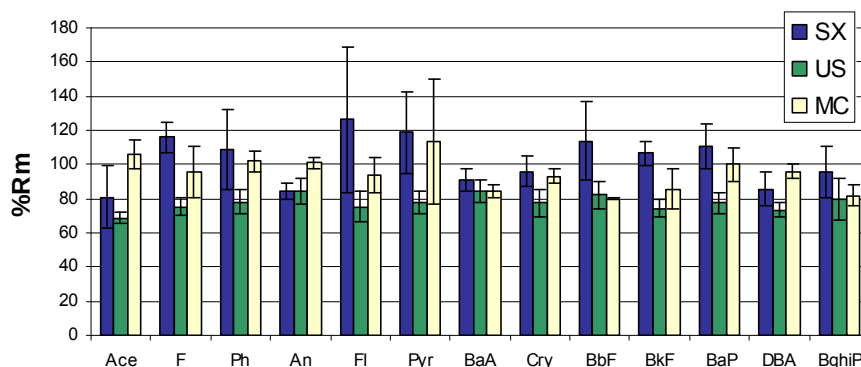
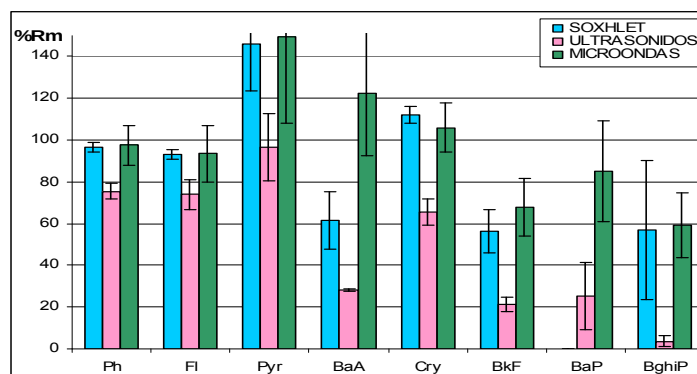


Figura 3.2 Porcentajes de recuperación medios obtenidos para PAH's empleando las técnicas de extracción con DCM

Otra serie de ensayos comparativos se realizó con el material de referencia SRM2975 y de nuevo destacaron ambas técnicas de extracción frente a la de ultrasonidos (Figura 3.3)



** El Pyr presenta una contaminación

*** El BaPyr en el SX presenta una contaminación en todos los ensayos que se realizaron

Figura 3. 3 Rendimientos de extracción obtenidos para el material de referencia 2975

Sobre la base de los buenos resultados obtenidos, el empleo de menor cantidad de disolvente, una reducción significativa en cuanto a la manipulación de la muestra y el tiempo de análisis, junto con la posibilidad de realizar hasta 11 muestras más un blanco de manera simultánea, se seleccionó el método optimizado mediante extracción asistida por microondas para la recuperación de los PAH's en las muestras de filtros.

Para los OHPAH's:

El número de análisis realizados para todas las pruebas que se llevaron a cabo con estos compuestos fue como mínimo de 5. Cuando se emplearon las técnicas de SX y MAE, en las que las temperaturas fueron relativamente altas, se obtuvieron rendimientos prácticamente nulos. La tendencia a la degradación de estos compuestos, sobre todo del 1-OHPyr, puede justificar estos resultados. Sólo para el 2-OHPh los rendimientos fueron satisfactorios tras la extracción con DCM mediante SX (Figura 3.4).

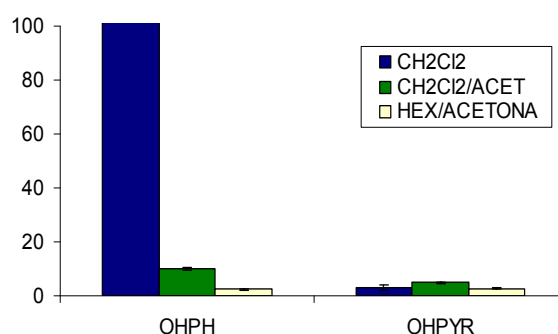


Figura 3.4. Rendimientos obtenidos para los OHPAH's con diferentes disolventes con SX

Los resultados obtenidos tras la extracción con USE a temperatura ambiente, con 50 mL de distintos disolventes durante 30 minutos en tubos abiertos se recogen en la Tabla 3.1.

Tabla 3. 1. Tubos abiertos con 50 ml de distintos disolventes durante 30 minutos

100%MEOH	Rm (%)	100%CH ₂ Cl ₂	Rm(%)	100%Acetona	Rm (%)
2-OHPH	67	2-OHPH	77	2-OHPH	40
1-OHPYR	1	1-OHPYR	1	1-OHPYR	0

Siguiendo este protocolo e introduciendo algunos cambios, tales como operar a temperaturas más bajas y emplear tubos cerrados, los rendimientos de extracción aumentaron considerablemente, hasta llegar a alcanzar el 80% con metanol como disolvente (Figura 3.5).

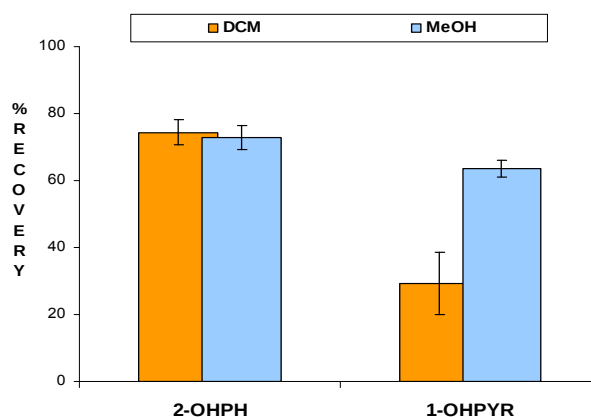


Figura 3. 5. Tubos cerrados 20 ml de MeOH, 20 minutos USE frío, 15 minutos congelador (n=8)

El volumen óptimo de disolvente fue de 15-20 mL, con el que se lograba cubrir la totalidad del filtro cuarteado. Fue necesario solamente un ciclo de 20 minutos, porque las re-extracciones tampoco aportaron un aumento significativo en los rendimientos. La temperatura del baño se consiguió mantener fría durante todo el tiempo de operación mediante adición de hielo picado, evitando la posibilidad de pérdidas por volatilizaciones. Posteriormente a la extracción, la solución se dejó reposar en el congelador durante 20 minutos.

Debido a la ausencia de materiales certificados para la determinación de estos compuestos, las extracciones solo se realizaron con patrones.

3.1.2 ETAPA DE PURIFICACIÓN O “CLEAN UP” DEL EXTRACTO

En la Tabla 3.2 se muestran los resultados obtenidos para PAH's cuando se empleó extracción en fase sólida con columna abierta, con columnas de 10 cm rellenas de gel de sílice y elución con hexano.

Tabla 3. 2. Rendimientos obtenidos para PAH's en el estudio de “clean-up” con columnas de SiO₂

	%Rm	desv
Ace	79	9
F	84	23
Ph	94	10
An	89	10
Fl	97	4
Pyr	98	3
BaAn	95	1
Cry	97	2
BbFl	72	2
BkFl	97	3
BaPyr	93	3
DBA	93	3
BghiP	91	7

En la Tabla 3.3 se recopilan los resultados obtenidos cuando se emplearon cartuchos comerciales SEP_PAK de C₁₈ como método de purificación de los extractos en la determinación de PAHs.

Tabla 3. 3. Rendimientos obtenidos para los PAH's mediante MSPE C₁₈ (n=5)

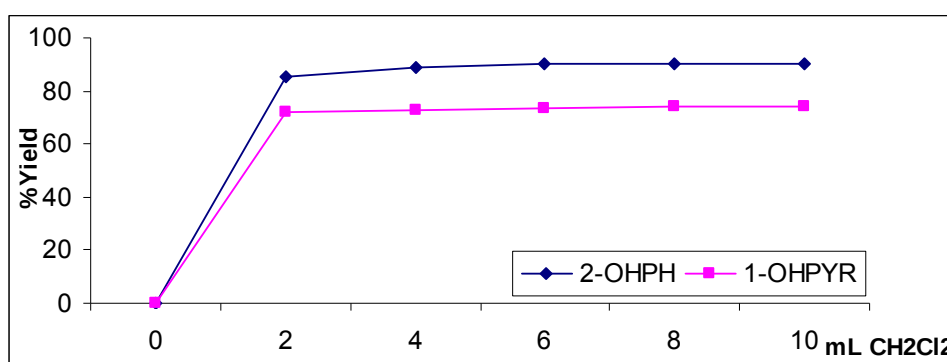
cartuchos C18	%Rm	desv
Ace	66	5,7
F	72	3,1
Ph	79	0,9
An	78	0,9
Fl	53	2,8
Pyr	52	0,8
BaAn	78	0,9
Cry	78	1,3
BbFl	78	0,4
BkFl	79	1,5
BaPyr	76	2,2
DBA	76	2,2
BghiP	74	1,4

Para la familia de los OHPAH's se probaron cartuchos de C₁₈ y sílice, los resultados se muestran en la Tabla 3.4-5.

Tabla 3. 4. Rendimientos obtenidos para OHPAH's mediante MSPE C₁₈

C18 4 mL CH ₂ Cl ₂ /Acetona		
	Rm (%)	s
OHPH	84	2,8
OHPYR	37	0,7
C18 4 mL CH ₂ Cl ₂ /Hexano		
	Rm (%)	s
OHPH	35	2,1
OHPYR	24	2,1

Para optimizar el volumen necesario de DCM implicado en la elución de los dos derivados hidroxilados, se investigaron las recuperaciones obtenidas a medida que se aumentaba el volumen de DCM utilizado (Figura 3.6).

**Figura 3. 6.** Variación de los rendimientos de los OHPAH's en función del volumen de eluyente

Con los cartuchos de SiO₂ no se obtuvieron resultados satisfactorios para el OHPYR. Los resultados de ambos compuestos se muestran en la Tabla 3.5. Esto puede ser debido a que el carácter más polar de la sílice produzca una fuerte retención del OHPYR, inhibiendo la elución posterior con DCM

Tabla 3. 5. Rendimientos obtenidos con los MSPE de relleno de SiO₂

Si 6 mL CH ₂ Cl ₂		
	Rm (%)	s
OHPH	90	10
OHPYR	1.7	1.2

3.1.3 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

PAH's

Las condiciones de operación del detector de fluorescencia se recogen en la Tabla 3.6, en la que se incluyen las longitudes de onda de excitación/emisión (λ) y los tiempos de retención (t_r) característicos de los compuestos de interés.

Tabla 3. 6. Condiciones de operación del detector de fluorescencia

Tiempo min	λ exc nm	λ em nm	Compuestos analizados
0	280	320	Na, Ace, F
13.10	250	360	Ph
14.05	250	370	An
15.45	240	460	Fl
16.35	250	370	Pyr
19.10	270	390	BaA, Cry
21.50	300	430	BbF, BkF, BaP, DBA, BghiP

En cuando a las condiciones operativas de la bomba cromatográfica, en la Tabla 3.7 se recopilan las optimizadas para el análisis de los PAH's. Un cromatograma representativo obtenido en estas condiciones a partir de una disolución de 50 ng.mL⁻¹ se muestra en la Figura 3.7.

Tabla 3. 7. Condiciones de operación de la bomba cuaternaria

Tiempo min	Acetonitrilo %	Agua %
0	45	55
2	45	55
25	100	0
30	100	0
32	45	55
37	45	55

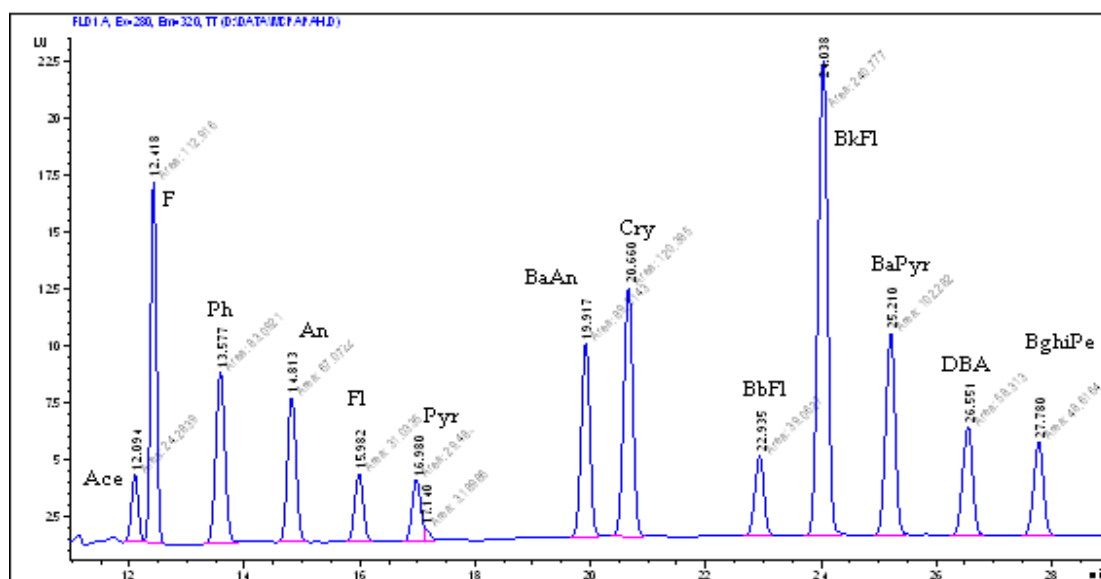


Figura 3. 7. Cromatograma correspondiente al análisis de una disolución patrón que contenía los PAHs de interés en concentración de 50 ng.mL⁻¹.

OHPAH's

Posteriormente se hicieron análisis con los dos compuestos en conjunto y se llegó a las condiciones que se detallan a continuación:

- Temperatura: 36-37°C
- Volumen de inyección: 25 μL
- Caudal: 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
- Tiempo de análisis: 7 minutos
- Condiciones de la bomba: Modo isocrático acetonitrilo/agua+ ácido acético 1%
- Longitudes de onda:

0-4.5 minutos λ : 259-386 nm. OHPH

4.5-7 minutos λ : 3742-388 nm. OHPYR

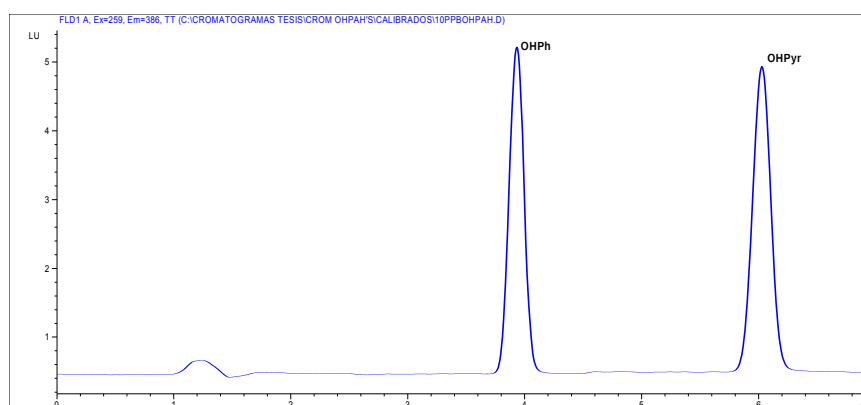


Figura 3. 8. Cromatograma obtenido tras el análisis de una disolución patrón que contenía los derivados hidroxilados de interés en concentración de $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$

3.1.4 PARÁMETROS DE CALIDAD

3.1.4.1 Intervalos de linealidad

PAH's

En el intervalo de concentraciones de $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $1000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ la respuesta del detector fue lineal para todos los compuestos estudiados. La calibración de la instrumentación se basó en la utilización de, como mínimo, cuatro disoluciones de calibrado, preparadas a partir de las mezclas patrón, cubriendo el rango de concentraciones en el que la respuesta del detector fue lineal.

Para minimizar el error asociado a las determinaciones, se emplearon dos intervalos de concentración dependiendo de la señal analítica obtenida, concentraciones bajas ($10\text{-}100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) y concentraciones altas ($100\text{-}1000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Tabla 3.8).

Tabla 3. 8. Área y coeficientes de los compuestos de interés para las distintas rectas de calibrado

áreas	5-1000ppb									cc bajas					
	5	5	10	25	50	100	250	500	1000	m	b	r	m	b	r
Na	0,76	0,77	1,5	3,4	6,6	14	32	68	134	0,13	0,02	0,99989	0,14	0,01	0,99989
Ace	2,2	1,8	3,5	8,3	17	34	82	174	341	0,34	-0,13	0,99998	0,34	0,16	0,99998
F	8,5	8,3	16	39	81	162	384	802	1561	1,57	1,80	0,99998	1,62	-0,18	0,99998
Ph	6,3	6,1	12	27	55	111	262	550	1087	1,09	0,10	0,99997	1,10	0,44	0,99997
An	4,5	4,6	8,7	20	41	81	192	404	802	0,80	-0,22	1,00000	0,81	0,45	1,00000
Fl	2,5	2,5	4,7	11	22	44	105	219	434	0,43	0,04	1,00000	0,44	0,26	1,00000
Pyr	3,5	2,1	4,2	8,8	17	36	84	177	350	0,35	0,25	0,99998	0,35	0,63	0,99998
BaAn	6,5	6,5	12	28	59	118	280	588	1158	1,16	0,03	0,99998	1,18	0,11	0,99998
Cry	9,1	8,8	17	39	83	164	389	816	1604	1,61	0,57	1,00000	1,64	0,29	1,00000
BbFl	2,6	2,9	5,5	13	26	53	125	263	522	0,52	-0,30	0,99999	0,53	0,02	0,99999
BkFl	17	18	34	80	166	331	780	1586	2865	2,90	26,03	0,99875	3,30	0,29	0,99875
BaPyr	8,5	7,1	13	31	65	129	304	642	1301	1,30	-2,54	0,99817	1,28	0,62	0,99817
DBA	4,7	4	8,1	19	39	79	188	397	813	0,81	-2,67	0,99999	0,79	0,10	0,99999
BghiP	4	3,3	7	14	29	59	140	298	656	0,65	-5,45	0,99942	0,58	0,52	0,99942

OHPAH's

Para los OHPAH's el protocolo fue exactamente igual que para el resto de compuestos estudiados. En la Figura 3.9 se representan los dos intervalos de concentración estudiados.

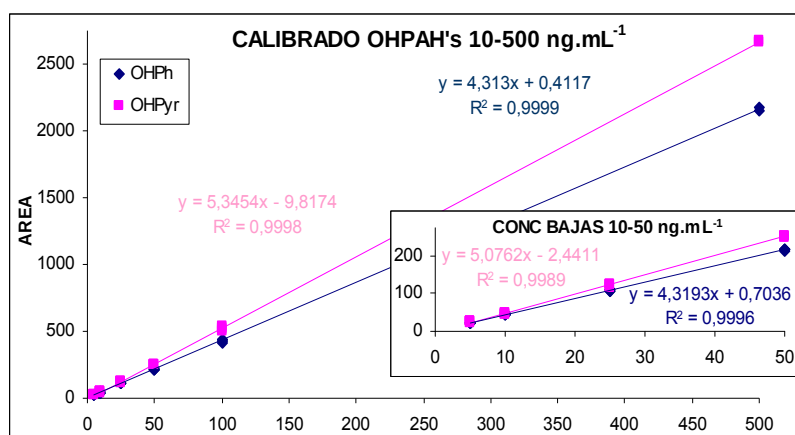


Figura 3. 9. Calibrado obtenido para los OHPAH's

3.1.4.2 Sensibilidad y Límites de Detección

PAH's

La sensibilidad del método, considerada como la pendiente de la recta de calibrado, se determinó a partir del ajuste por mínimos cuadrados de las respuestas obtenidas tras los análisis de disoluciones en concentraciones de 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 ng.mL⁻¹ de cada

uno de los PAH's en estudio, al igual que los límites de detección instrumental, considerados como tres veces la desviación típica obtenida tras el análisis de una disolución con 5 ng.mL⁻¹.

Tabla 3. 9. Límites de detección instrumental y repetibilidad para los PAH's

Compuesto	Repetibilidad(%)	Sensibilidad calibrado	Mínima concentración detectable ng.mL⁻¹ LD instrumental
Na	6,1	0,14	2,5
Ace	7,5	0,32	2,0
F	5,7	1,4	0,10
Ph	4,2	1,0	0,10
An	6,2	0,80	1,5
Fl	6,6	0,40	0,30
Pyr	3,4	0,38	2,5
BaAn	4,0	1,1	2,0
Cry	6,1	1,5	2,0
BbFl	5,4	0,49	0,30
BkFl	4,5	2,7	0,30
BaPyr	7,.	1,3	0,30
DBA	3,1	0,73	0,30
BghiP	6,8	0,58	0,90

La repetibilidad se dedujo a partir de los análisis de cuatro disoluciones en concentración 10 ng.mL⁻¹ (Tabla 3.9). Para calcular los límites de detección del método analítico se llevó a cabo el análisis de 4 muestras blanco.

El límite de detección del método analítico se expresa en términos de concentración detectable por el equipo cromatográfico. Así, éste se ha deducido a partir de tres veces la desviación estándar de la respuesta del blanco, valor que es considerado como la respuesta o señal analítica registrada por el equipo y que es transformada o convertida en la concentración mínima detectable mediante la aplicación de la curva de calibrado.

Tabla 3. 10. Límites de detección analíticos para los PAH's (ng.mL⁻¹)

Compuesto	Filtro
Na	4.2
Ace	2.8
F	1.2
Ph	2.3
An	1.3
Fl	2.3
Pyr	2.4
BaAn	2.6
Cry	2.7
BbFl	2.1
BkFl	1.7
BaPyr	1.6
DBA	1.3
BghiP	1.9

OHPAH's

Los límites de detección se calcularon a partir de la recta de calibrado de ambos compuestos, y fue calculada como tres veces la desviación típica obtenida del análisis de una disolución de 5 ng.mL⁻¹ (n=5). La sensibilidad, pendiente de la recta de calibrado, se dedujo a partir del ajuste por mínimos cuadrados de las respuestas obtenidas tras los análisis de disoluciones en concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 250, y 500 ng.mL⁻¹ de cada uno de los OHPAH's. La repetibilidad del método se realizó mediante el análisis de cinco disoluciones de 5 ng.mL⁻¹.

Tabla 3. 11. Límites de detección instrumental y repetibilidad para los OHPAH's

OH-PAHs	Repetibilidad(%)	Sensibilidad	Límite detección (ng/ml)
2-OH-Ph	4.0	4.3	0.80
1-OH-Pyr	4.0	5.3	1.2

En cuanto al límite de detección del método analítico, el análisis de 5 filtros blanco condujo a valores próximos a 5 ng mL⁻¹, establecidos como tres veces la desviación típica del valor medido.

Tabla 3. 12. Límites de detección del método analítico para los OHPAH's

Compuesto	Filtro
2-OHPh	4.5
1-OHPyr	4.3

3.1.4.3 Validación de los métodos analíticos

Para la validación de los métodos optimizados, se llevaron a cabo diferentes estudios mediante análisis de materiales de referencia, participación en ejercicios intercomparativos y comparación de datos espectrales entre disoluciones patrón y extractos de las muestras de interés. En particular, se procedió para cada familia de compuestos, según se indica:

PAH's

Por una parte, se llevaron a cabo análisis, como mínimo por triplicado, de 3 materiales de referencia, correspondientes a SRM 1975: un extracto de partículas diésel (SRM1975), un material particulado diésel (SRM 2975) y un material particulado procedente de una zona urbana (SRM 1649a). En la Tabla 3.13 se muestran las concentraciones obtenidas mediante nuestro método y los valores certificados. Como se puede apreciar no hay diferencias significativas en las concentraciones, por lo que nuestro método es válido para la determinación de PAH's.

La Unidad de Cromatografía del CIEMAT participa además regularmente en análisis intercomparativos de compuestos orgánicos en diversas matrices orgánicas.

Con el objetivo de ratificar la validez del sistema analítico para la determinación de PAH's en muestras de material particulado, se presentan los resultados obtenidos en el ejercicio intercomparativo "07CS2" del programa Quality Consult del 2007 y organizado por "Associazione per lo sviluppo della qualità ambientale". Este estudio implicaba la determinación de An, BbFl, BghiPe, BkFl, Cry, Ph, Fl, InP y Pyr en suelos contaminados.

Las concentraciones certificadas de los 9 PAH's evaluados en el estudio estaban comprendidas entre 0.16 – 149 mg.Kg⁻¹. Nuestro laboratorio, realizó el análisis de los PAH's mediante HPLC con detector de fluorescencia.

Tabla 3. 13. Validación del método de análisis para PAH's

Validación instrumental			Validación metodología analítica			
SRM 1975			SRM 2975		SRM 1649a	
PAH's	Valor medido	Certificado o ref. ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Valor medido	Certificado o ref. ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Valor medido	Certificado o ref. ($\mu\text{g.g}^{-1}$)
Ph	8.6 $\pm$ 0.3	8.0 $\pm$ 0.2	16.5 $\pm$ 0.3 ₅	17 $\pm$ 3	4.6 $\pm$ 0.3	4.1 $\pm$ 0.4
An					0.5 $\pm$ 0.1	0.43 $\pm$ 0.08
Fl	13.5 $\pm$ 0.5	13.5 $\pm$ 0.6	26.2 $\pm$ 0.6	27 $\pm$ 5	6.2 $\pm$ 0.1	6.5 $\pm$ 0.2
Pyr			1.1 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.2	6.6 $\pm$ 0.5	5.3 $\pm$ 0.2 ₅
BaA	0.06 $\pm$ 0.00 ₂	0.09 $\pm$ 0.01 ₅	0.45 $\pm$ 0.08	0.32 $\pm$ 0.07	2.07 $\pm$ 0.08 ₈	2.21 $\pm$ 0.07
Cry	2.16 $\pm$ 0.08	1.95 $\pm$ 0.07	5.2 $\pm$ 0.2	4.6 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 0.3	3.05 $\pm$ 0.06
BbF	3.2 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.1			5.0 $\pm$ 0.1	6.5 $\pm$ 0.6
BkF	0.144 $\pm$ 0.005	0.17 $\pm$ 0.05	0.55 $\pm$ 0.09 ₆	0.68 $\pm$ 0.08	1.63 $\pm$ 0.03 ₂	1.91 $\pm$ 0.03 ₁
BaP			0.05 $\pm$ 0.02	0.052 $\pm$ 0.005	1.7 $\pm$ 0.3	2.51 $\pm$ 0.08 ₇
DBA	0.086 $\pm$ 0.003	0.08 $\pm$ 0.01			0.150 $\pm$ 0.007	0.29 $\pm$ 0.02
BghiP			0.32 $\pm$ 0.11	0.498 $\pm$ 0.044		4.0 $\pm$ 0.9
	0.110 $\pm$					
Ind	0.006	0.12 $\pm$ 0.01				

Para evaluar la calidad de nuestros resultados se representa el valor de Z-scores, definido de acuerdo con la siguiente expresión:

$$Z = \frac{(X_{\text{lab}} - X_{\text{ref}})}{\sigma}$$

Donde X_{lab} es la concentración obtenida en el laboratorio, X_{ref} es la concentración certificada y s es la desviación estándar de la concentración certificada. En la Figura 3.10 se presentan los resultados obtenidos.

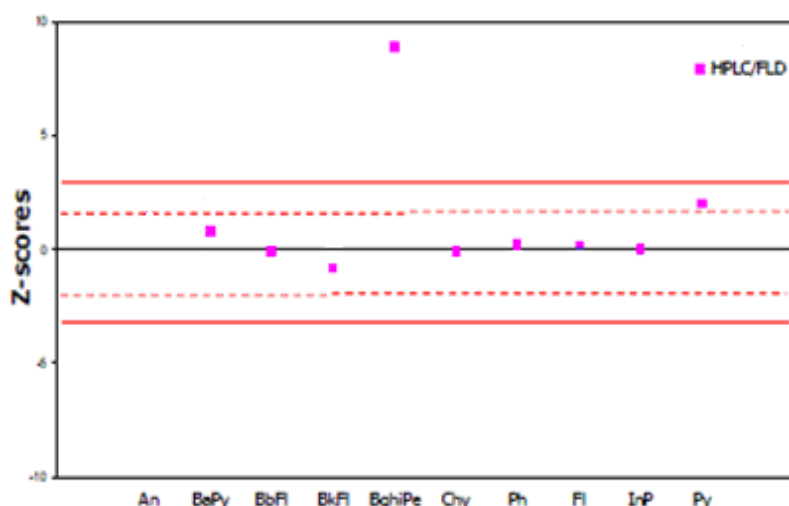


Figura 3. 10. Resultados obtenidos en el estudio intercomparativo

Como puede observarse en la figura, los valores de Z-scores fueron inferiores a ± 2 , considerándose satisfactorios, excepto para el B(ghi)P que alcanzó valores muy elevados probablemente debido a interferencias por otros compuestos.

OHPAH's

Ante la carencia de materiales de referencia con valores certificados de estos compuestos, se llevó a cabo un estudio comparativo mediante variación de longitudes de onda de excitación y emisión entre disoluciones patrón y extractos de las muestras de interés.

Los espectros obtenidos se incluyen en las Figuras 3.11-12. Como se puede observar, los espectros de excitación y emisión de las muestras son similares a los de la disolución patrón.

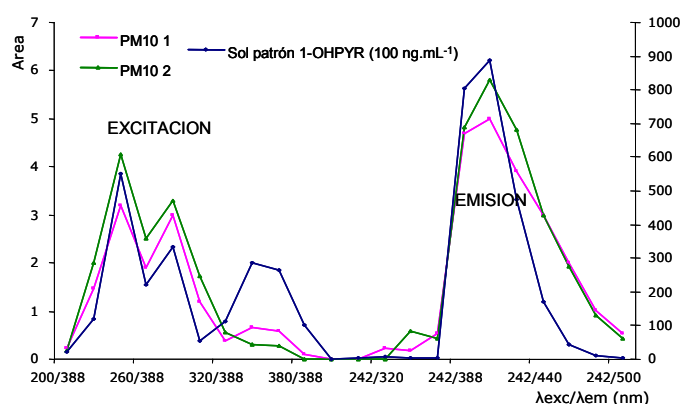


Figura 3. 11. Variación de las longitudes de onda de excitación y emisión de 1-OHPYr, obtenidas para una disolución patrón de 100 ng.mL^{-1} y dos extractos de muestra PM₁₀.

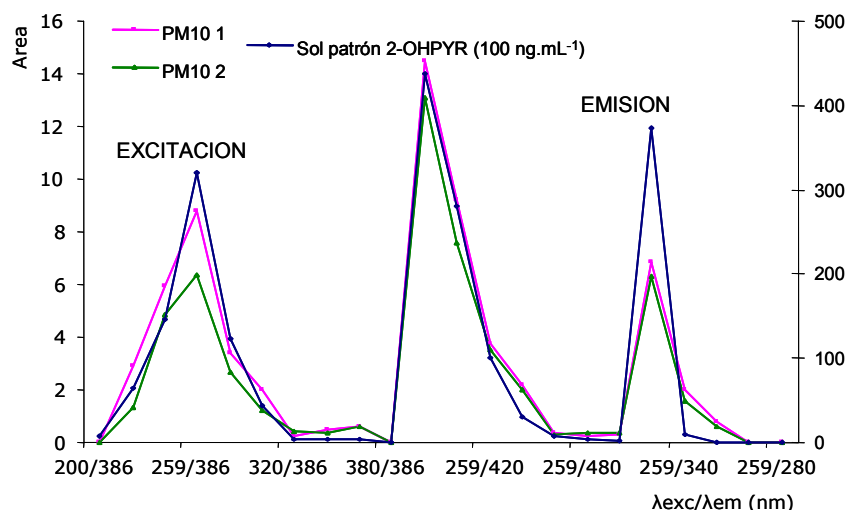


Figura 3. 12. Variación de las longitudes de onda de excitación y emisión del 2-OHPPh, obtenidas tras el análisis de un patrón de 100 ng.mL⁻¹ y dos extractos de muestra PM₁₀.

3.1.5 APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS AMBIENTALES

Para el análisis de los filtros cargados con aerosol, cada uno de los mismos se dividió en dos mitades similares y fueron identificados mediante pesada en balanza de precisión. Una de las mitades se empleó para el análisis de PAH's y la otra se reservó para el análisis de OHPAH's. El método de análisis de las muestras de fase particulada se llevó a cabo mediante extracción asistida con microondas para la determinación de PAH's, aplicando un solo ciclo de extracción con 20 mL de DCM. Las Figuras 3.13 muestra un cromatograma representativo de los análisis efectuados a partir de extractos de filtros cargados con muestras de aire.

Los cromatogramas se caracterizaron por líneas base limpias, libres de interferencias y buena resolución de los picos de interés, en general, en el caso de la determinación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, a excepción de la zona de elución de BaAn y Cry.

Para la extracción de los OHPAH's se emplearon 15 ml de metanol, mediante un solo ciclo de USE, durante 20 minutos en tubos roscados cerrados y envueltos con papel de aluminio, con adición de hielo al baño de ultrasonidos para evitar degradaciones y volatilizaciones de la muestra, como ya se ha indicado previamente. Un cromatograma representativo del análisis de una muestra de aerosol para la determinación de los derivados hidroxilados se recoge en la Figura 3.14 Como puede apreciarse, se consiguió buena resolución cromatográfica, obteniendo una línea base limpia.

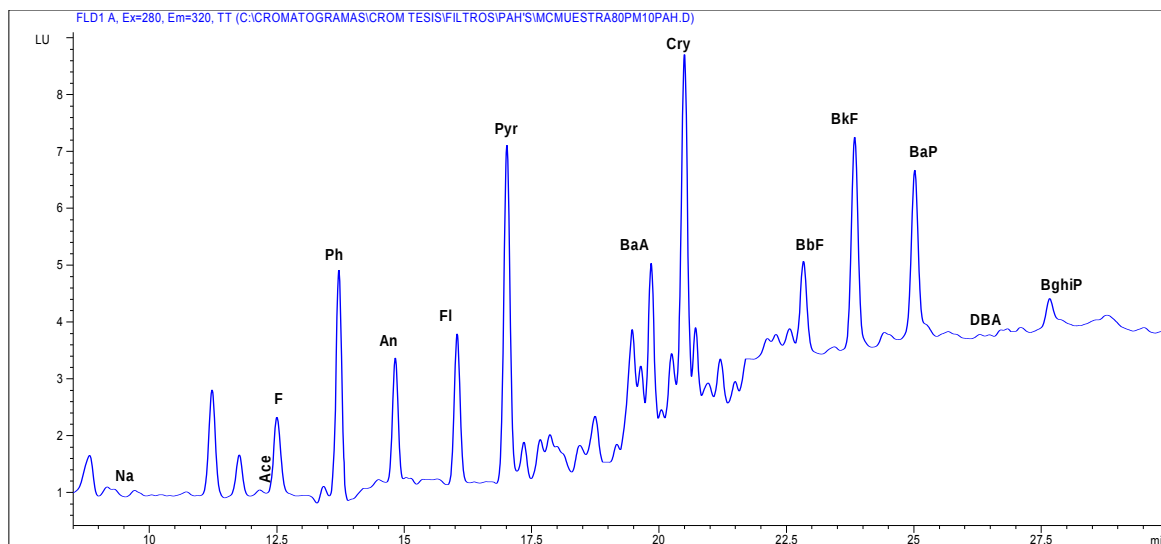


Figura 3. 13. Cromatograma representativo del análisis de una muestra de aire ambiente recogida en filtro para la determinación de los PAH's considerados de interés.

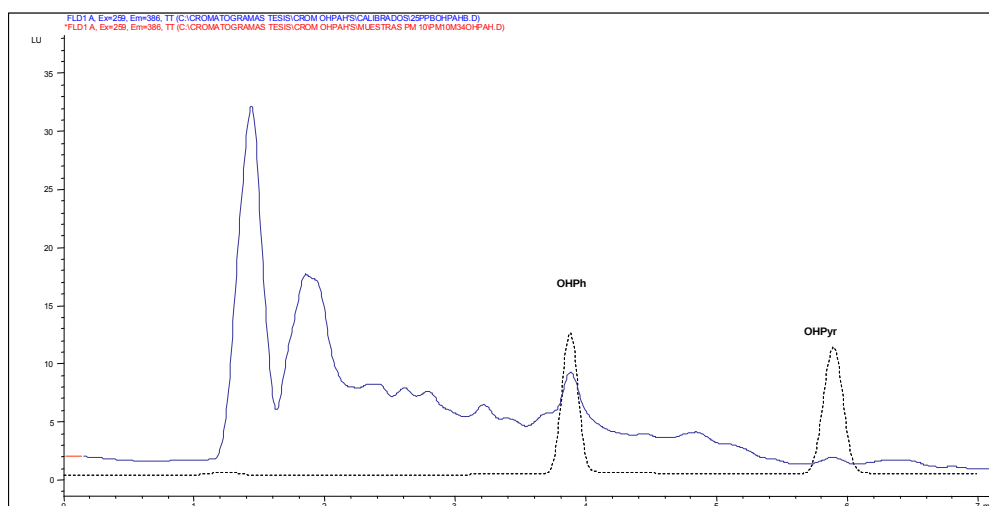


Figura3.14. Cromatograma representativo del análisis de una muestra de aire ambiente recogida en filtro para la determinación de los OHPAH's de interés.

Se realizaron ensayos mediante adición de patrón en concentración conocida a muestras reales para valorar el efecto de la matriz en los rendimientos de extracción de las tres familias de compuestos. Los resultados fueron igual de satisfactorios que con los patrones.

Un estudio comparativo entre los análisis de las muestras para la determinación de PAH's con/sin etapa previa de purificación no mostró diferencias en cuanto a la identificación, sin conseguir mejoras en el perfil de las líneas base de los cromatogramas obtenidos. Asimismo, no se obtuvieron diferencias en cuanto a la cuantificación final de los picos cromatográficos correspondientes (Figura 3.15). Por tanto, se decidió prescindir de la etapa de purificación del extracto, lo que supuso una gran simplificación del método de

análisis y reducción del tiempo necesario para el mismo, además de la reducción en la manipulación de las muestras que conlleva la posibilidad de pérdidas de analito y contaminación de las mismas.

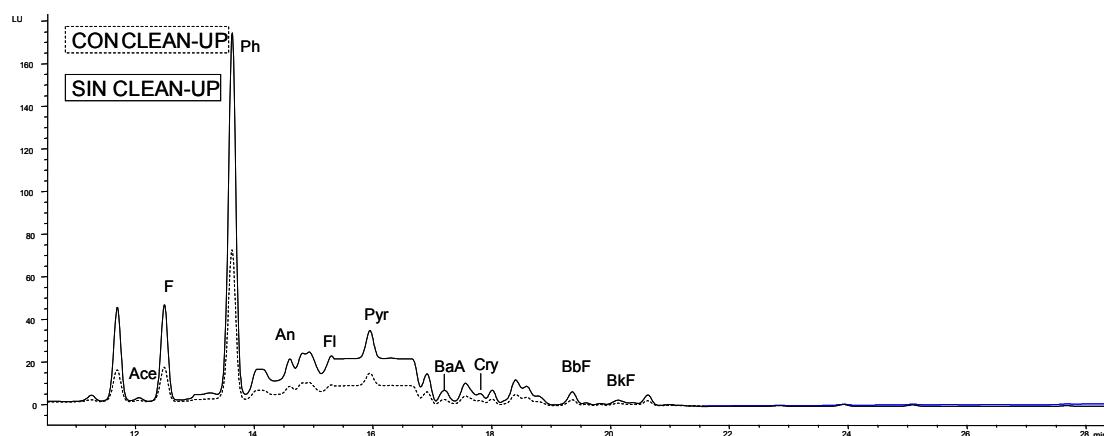


Figura 3.15. Cromatogramas representativos del análisis de una muestra de aire ambiente para la determinación de PAHs de interés para el estudio de la influencia de la etapa de purificación durante el tratamiento de las muestras.

**T La reducción de la señal analítica del cromatograma obtenido tras la etapa de clean-up se corresponde con el efecto de dilución de la disolución analizada.

Los análisis cromatográficos se realizaron según se detalla en el Apdo 2.6, identificándose todos los compuestos aromáticos policíclicos considerados de interés en la memoria, sobre la base de su representatividad medioambiental en cuanto a abundancia y toxicidad.

Cabe señalar que la cuantificación final de los compuestos en los extractos correspondientes a los dos tipos de muestras estudiadas, se realizó considerando siempre el correspondiente blanco de control.

3.2 CARACTERIZACIÓN ANUAL DE LOS COMPUESTOS ESTUDIADOS

3.2.1 ANÁLISIS GRAVIMÉTRICO

El análisis gravimétrico se realizó a partir de un total de 104 filtros cargados con materia particulada, de los que 55 correspondieron a PM₁₀ y 49 a PM_{2.5}. Una comparación entre los resultados experimentales medidos en este trabajo y los obtenidos en la estación de Isaac Peral, registrados en base de datos de la CAM se muestra en las Figuras 3.16-17.

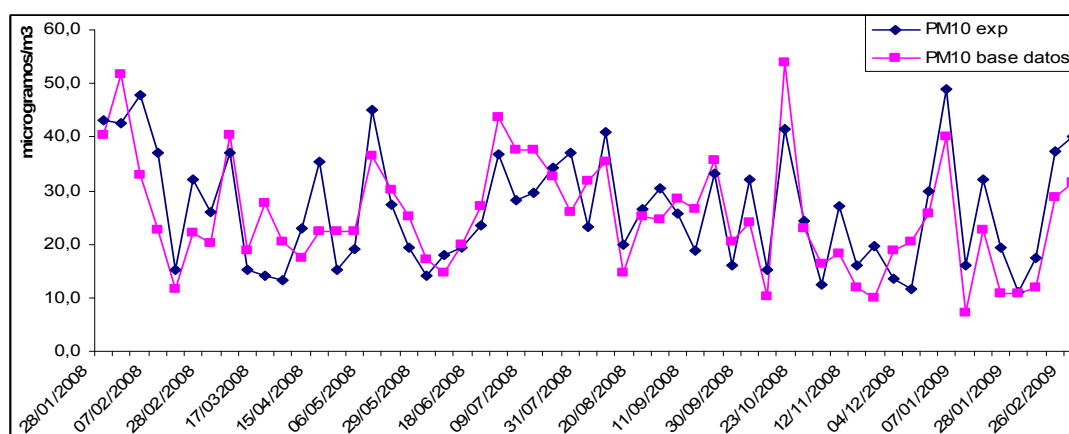


Figura 3.16. Análisis gravimétrico de la fracción de PM₁₀.

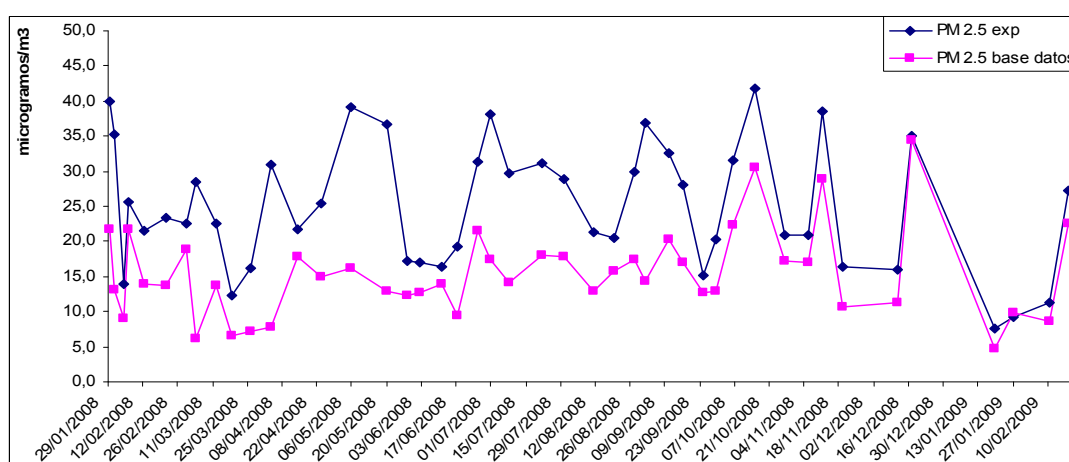


Figura 3.17. Análisis gravimétrico de la fracción de PM_{2.5}.

Como puede observarse, la fracción PM₁₀ medida durante el muestreo efectuado en este trabajo y la documentada siguen la misma variación a lo largo del año, aunque para la fracción de PM_{2.5}, se obtiene la misma variación, si bien los valores medidos en este trabajo fueron relativamente superiores.

La Tabla 3.14 incluye los valores máximos, mínimos y promedio de los análisis gravimétricos agrupados estacionalmente, sin observarse una tendencia estacional de los valores registrados.

Tabla 3.14. Valores obtenidos para el análisis gravimétrico.

$\mu\text{g m}^{-3}$		Invierno	Primavera	Verano	Otoño
PM _{2.5}	Máximo	40	39	38	42
	Mínimo	7.6	12	16	15
	Promedio	22	25	28	28
PM ₁₀	Máximo	49	45	41	41
	Mínimo	11	13	18	12
	Promedio	30	23	28	23

Según la directiva 1999/30/CE (2010) los valores límite de PM_{10} son de $50 \mu g.m^{-3}$, umbral que no podrá sobrepasarse en más de 7 ocasiones al año, mientras que para $PM_{2.5}$ aunque no existe normativa vigente, existe un valor límite diario de $35 \mu g.m^{-3}$. En cuanto a la fracción PM_{10} no se registró ninguna medida superior al límite establecido en $50 \mu g.m^{-3}$, mientras que para el caso de $PM_{2.5}$, se midieron valores ligeramente superiores a $35 \mu g.m^{-3}$ en diez ocasiones, sin un significativo perfil estacional. Son varias las razones que pueden aumentar considerablemente los niveles de $PM_{2.5}$ y PM_{10} . Los fenómenos de estabilidad atmosférica favorecen los episodios de contaminación, ya que no se produce la dispersión de las partículas en la atmósfera. Estos episodios pueden ser responsables del aumento de los niveles de $PM_{2.5}$ y PM_{10} observados. Otros aportes extra de material particulado son causados por fenómenos de intrusión de polvo africano. Este hecho tiene una importancia mucho mayor en la fracción de PM_{10} , aunque en el $PM_{2.5}$ también puede contribuir ligeramente a un aumento de sus niveles. Por último, debido a que la zona de muestreo se localiza en una zona semi-urbana, el tráfico y el aporte biogénico pueden ser un origen de $PM_{2.5}$ y PM_{10} .

Los valores recogidos son mucho más bajos que los registrados en ciudades muy contaminadas como Nanking (China), donde se alcanzaron promedios de $247 \mu g.m^{-3}$ en verano (Wang et al., 2007), mientras que en Pekín (He et al., 2006), se midieron concentraciones medias de 66, 78, 77 $\mu g.m^{-3}$ en verano, otoño e invierno. En definitiva, los valores gravimétricos medidos se encontraron dentro de los límites establecidos según normativa vigente.

3.2.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE INTERÉS EN LAS MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES

El conjunto de datos anuales correspondientes a los valores de concentración de los compuestos de interés, parámetros meteorológicos y físico-químicos (concentraciones de otros contaminantes como óxidos de nitrógeno y azufre) se recogen como anexo I (PM_{10}), y anexo II ($PM_{2.5}$).

3.2.2.1 Fase particulada PM₁₀

PAH's

En las Figuras 3.18-20 se representan las variaciones anuales para las concentraciones de los PAH's estudiados. En general, destacaron los valores registrados en invierno respecto a los de verano. Así, los máximos de concentración se alcanzaron en épocas de frío (14/1/2009), mientras que los mínimos fueron registrados en épocas estivales. Dichas concentraciones mínimas se midieron entre los meses de primavera y verano, desde el 6 de junio de 2008 para BaAn, hasta el 28 de agosto de 2008 para el An, e incluso alguno de los mínimos, como por ejemplo los del Ph y el BkFl, se han registrado los días 2 y 9 de septiembre, respectivamente.

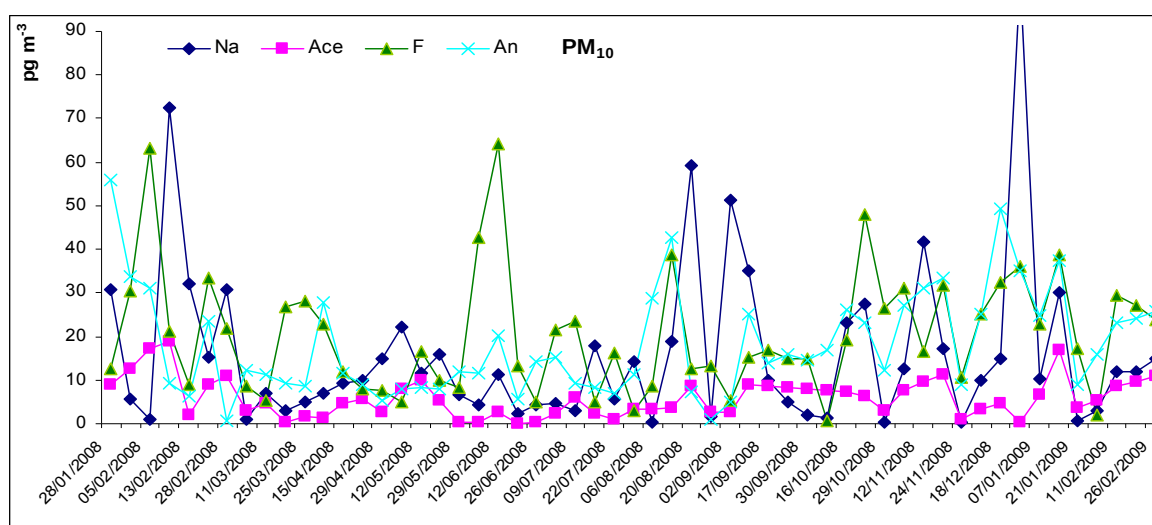


Figura 3. 18. Variación anual de los PAH's minoritarios

Cabe mencionar respecto a los datos correspondientes a naftaleno, que su medida analítica lleva implícita la posibilidad de errores por pérdidas tanto durante el propio proceso analítico, como durante el almacenamiento de las muestras; por tanto, los datos aportados deben considerarse semi-cuantitativos por el riesgo asociado de error analítico.

Los compuestos mayoritarios medidos en PM₁₀ fueron Ph, Fl, Pyr y Cry, llegando a alcanzar concentraciones superiores a 600 pg.m⁻³. En contra, los PAH's más volátiles (Na, Ace, y F) fueron medidos como minoritarios, alcanzando entre 60 y 100 pg.m⁻³. Estas variaciones corresponden claramente con la típica distribución de los PAH's más pesados en el material particulado (Araki et al., 2009; Callén et al., 2011; Callen et al., 2010; Saarnio et al., 2008; Tham et al., 2008; Wang et al., 2007)

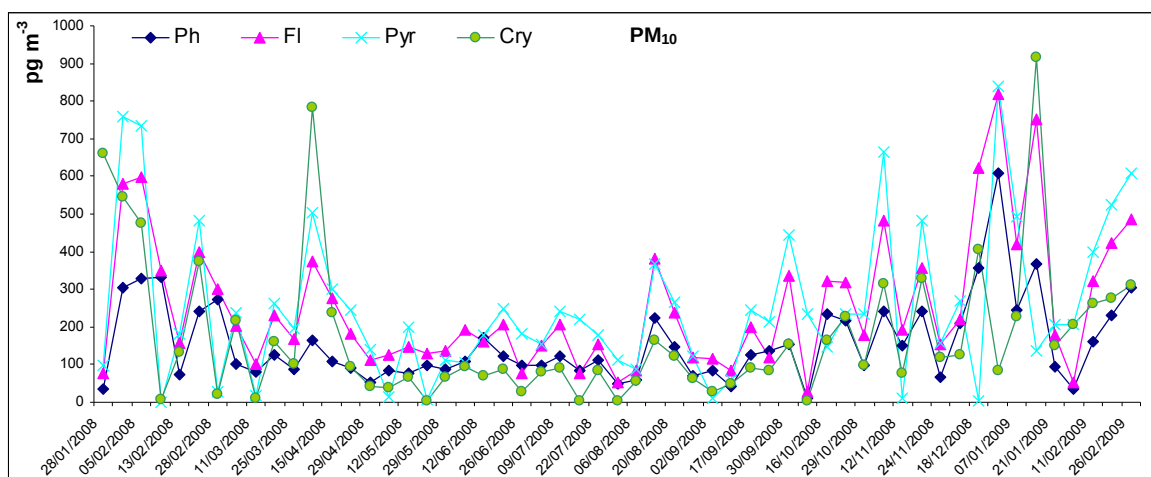


Figura 3.19. Variación anual de algunos PAH's mayoritarios

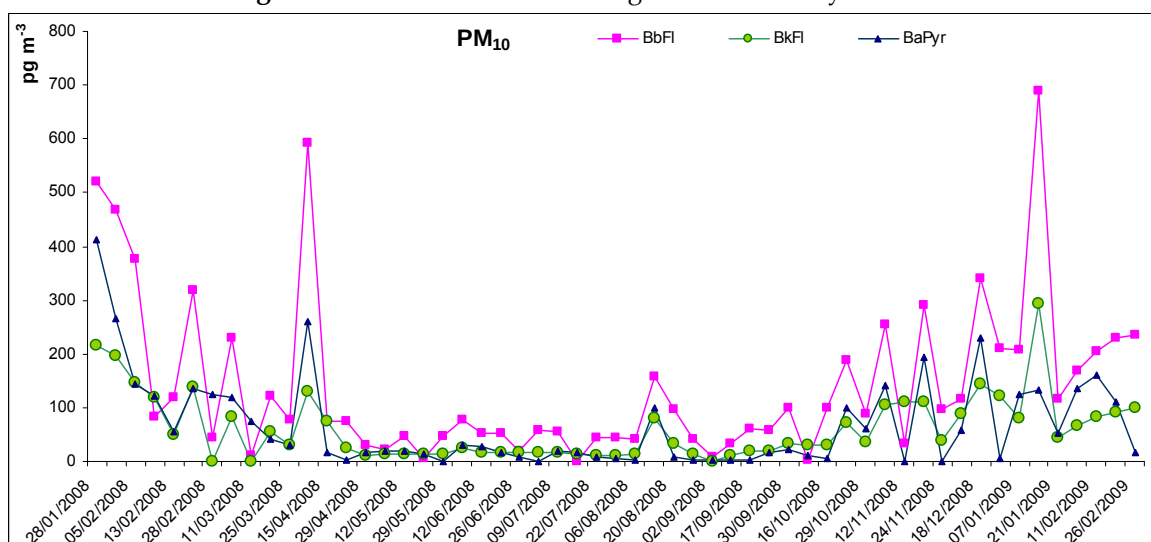


Figura 3.20. Variación anual de otros PAH's

Una representación de la variación mensual de los valores promedio de los compuestos agrupados conforme al número de anillos en su molécula se incluye en la Figura 3.21.

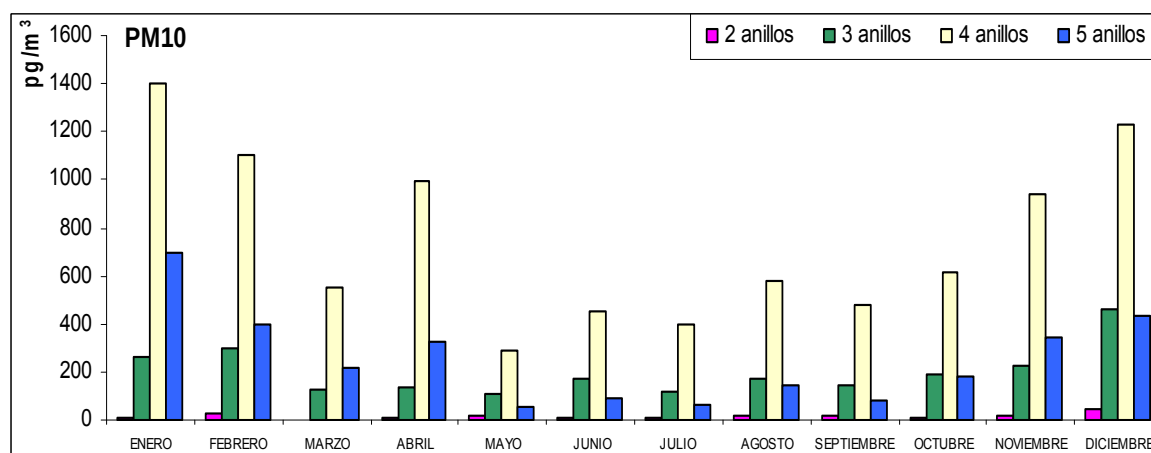


Figura 3.21. Variación mensual de los PAH's en la fracción PM₁₀

Por una parte, a partir de esta figura puede observarse claramente la predominancia de los PAH's con cuatro anillos, seguidos por los que incluyen 3 y 5 anillos, de acuerdo con la típica distribución de los compuestos menos volátiles en la fracción particulada. Por otra parte, quedan reflejados los mayores niveles de concentración registrados en los meses más fríos (noviembre-abril), frente a los más templados (de mayo a octubre). Estas observaciones coinciden con la habitual variación estacional que caracterizan las concentraciones de PAH's en partículas (Akyuz and Cabuk, 2008; Bacskay et al., 2008; Prevedouros et al., 2004a; Prevedouros et al., 2004b; Saarnio et al., 2008; Zhang and Tao, 2008). Los mayores niveles de concentración de PAH's en partículas medidos en invierno, sobre todo los menos volátiles, está relacionado con las bajas temperaturas, que favorecen los procesos de condensación/adsorción de estas especies en las partículas suspendidas en aire (Ravindra et al., 2006).

Los factores con mayor influencia en los niveles de concentración ambiental incluyen (Bacskay et al., 2008; Saarnio et al., 2008):

- Degradaciones químicas y fotoquímicas
- Intensidad de la luz y efecto de lavado
- Elevados índices de contaminación por calefacciones en invierno
- Formación de inversión de temperatura en invierno
- Elevada volatilidad de los PAH's con 3 y 4 anillos en verano

En general, las principales fuentes de emisión de PAH's a la atmósfera proceden del tráfico y otras fuentes de combustión. Se han sugerido posibles fuentes secundarias como volatilizaciones desde el suelo, agua, vegetación o superficies urbanas (Prevedouros et al., 2004a), si bien su contribución es mínima.

La Figura 3.22 muestra la variación mensual de la suma de las concentraciones de los PAH's estudiados, alcanzando un valor de entre 10-15 ng.m⁻³ para los meses de invierno y de 2-5 ng.m⁻³ en los de verano.

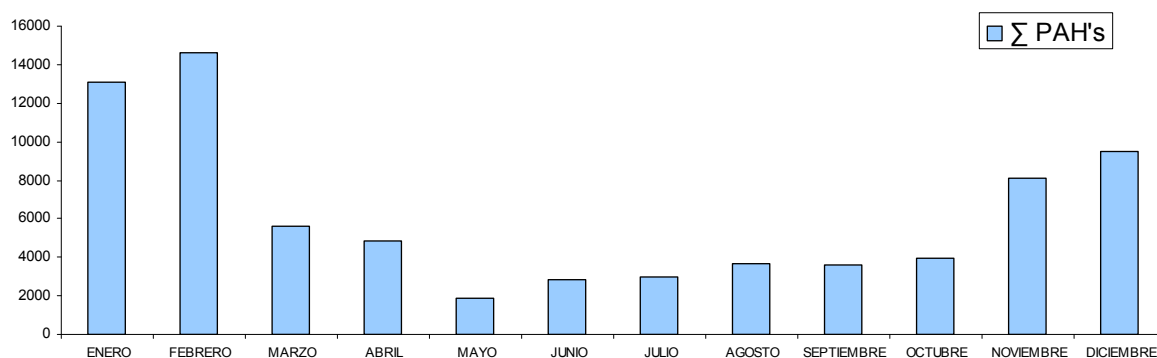


Figura 3.22. Variación mensual de la suma de las concentraciones de los PAH's de interés.

Asimismo, en la Tabla siguiente se muestra la variación estacional de los máximos, mínimos y concentraciones promedio obtenidas de la suma de los 12 PAH's, considerando como estaciones:

- Invierno, desde diciembre a febrero,
- Primavera, desde marzo a mayo,
- Verano, desde junio a agosto, y
- Otoño, desde septiembre a noviembre.

Tabla 3.15. Concentraciones de totales de PAH's (ng.m⁻³) en las estaciones del año para PM₁₀

ng m ⁻³	INVIERNO	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO
MAXIMO DIA	3.9	3.3	1.7	2.5
MINIMO DIA	0.88	0.33	0.34	0.32
PROMEDIO	2.0	0.94	0.73	1.05

OHPAH's

En el caso de los OHPAH's se observa claramente un aumento de las concentraciones en invierno (Figura 3.23), con concentraciones mayores de 2-OHPPh frente a los correspondientes a 1-OHPyr. Esta variación estacional fue aparentemente más apreciable que en el caso de los derivados nitrados.

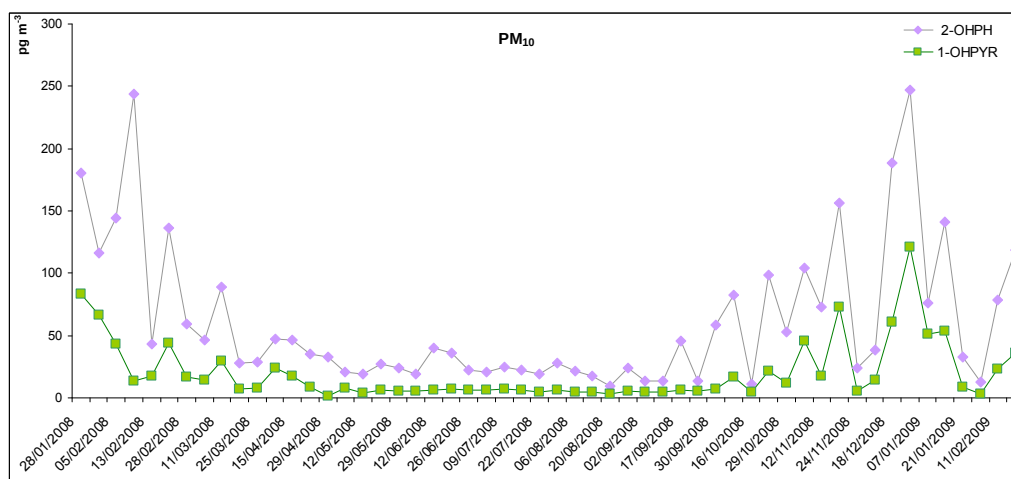


Figura 3.23. Variación anual de los OHPAH's estudiados

Se alcanzaron máximos de 247 pg.m^{-3} para OHPH y de 121 pg.m^{-3} para OHPyr registrados ambos el día 22 de diciembre de 2008, mientras que los mínimos fueron de 10 pg m^{-3} para OHPH (20 de agosto de 2008) y 2 pg.m^{-3} para OHPyr (29 de abril de 2008).

La Figura 3.24 muestra las concentraciones promedio mensuales del año de muestreo, indicando una pronunciada disminución en los meses estivales. Así, los niveles de concentración del OHPH y OHPyr en diciembre son del orden de 160 y 65 pg.m^{-3} , respectivamente, mientras que en agosto, las concentraciones disminuyen hasta 19 y 10 pg.m^{-3} respectivamente.

Comparativamente con los PAH's equivalentes, los valores promedio de los niveles de concentración de los derivados hidroxilados son 2.5 órdenes de magnitud más bajos en el caso del hidroxifenantreno, mientras que para el hidroxipireno la proporción fue de 13 órdenes por debajo.

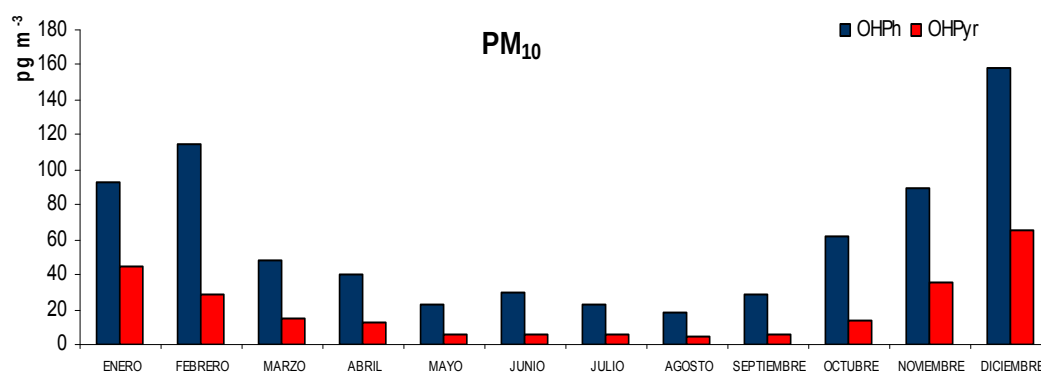


Figura 3.24. Variación mensual de los OHPAH's determinados en PM_{10}

En general los hidroxi derivados son menos volátiles que los PAH's equivalentes, por lo que tienden a estar más asociados a partículas(Vione et al., 2004). En cuanto a las posibles fuentes de emisión de estos derivados hidroxilados, se incluye su emisión directa desde fuentes de combustión y motores diésel (Atkinson et al., 1987) y su formación a través de la foto-oxidación de los PAH's equivalentes o bien mediante adición de radicales hidroxilo a éstos o a sus derivados nitrados(Atkinson and Arey, 2003). Asimismo, son menos estables que los PAH's equivalentes y pueden ser más fácilmente degradados bajo altas temperaturas ambientales, provocando su menor abundancia en verano respecto al invierno(Wang et al., 2007). Aunque el número de estudios realizados sobre la determinación de hidroxiderivados de PAH's en atmósfera es realmente escaso, los resultados obtenidos en este trabajo están de acuerdo en general con los documentados bibliográficamente(Galceran and Moyano, 1995; Wang et al., 2007).

Representando el sumatorio de ambos derivados (Figura 3.25), se obtuvieron valores máximos de concentración de 1.1 ng.m⁻³ registrados en febrero y mínimos de 0.09 ng.m⁻³ registrados en agosto de 2008.

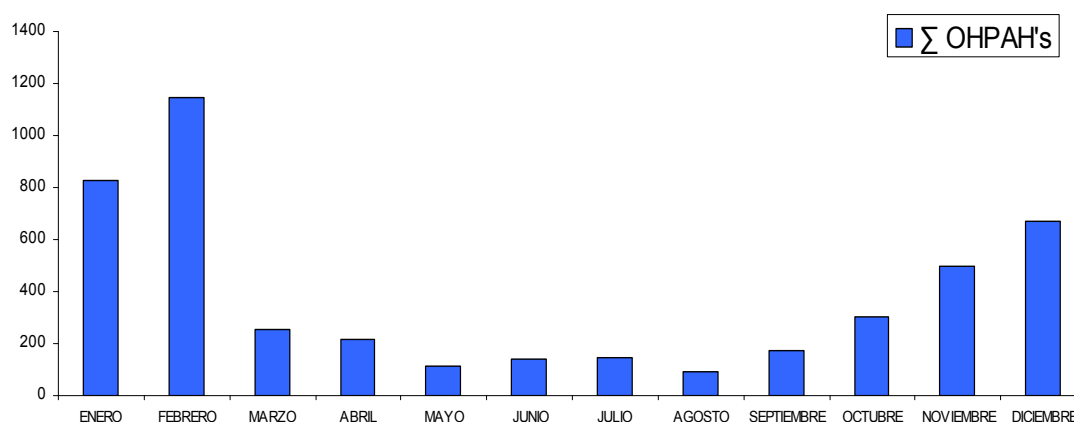


Figura 3.25. Variación mensual de la suma de concentraciones medidas de los dos OHPAH's estudiados

En la Tabla 3.16 se muestra la variación estacional de la suma de concentraciones de los dos hidroxi-derivados.

Tabla 3.16. Suma de las concentraciones de los dos OHPAH's en las estaciones del año para PM₁₀

ng m ⁻³	INVIERNO	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO
MAXIMO DIA	0.37	0.12	0.046	0.23
MINIMO DIA	0.016	0.023	0.013	0.016
PROMEDIO	0.16	0.049	0.029	0.075

3.2.2.2 Fase particulada PM_{2.5}

PAH's

En las Figuras 3.26-28 se representan las variaciones anuales correspondientes a las concentraciones de los PAH's estudiados en la fracción PM_{2.5}. Análogamente al caso de las muestras PM₁₀ y como era de esperar, se obtuvo un claro perfil estacional con niveles de concentración más elevados en los meses de invierno frente a los correspondientes a los meses de verano. Asimismo, las concentraciones medidas fueron más reducidas que para las de PM₁₀.

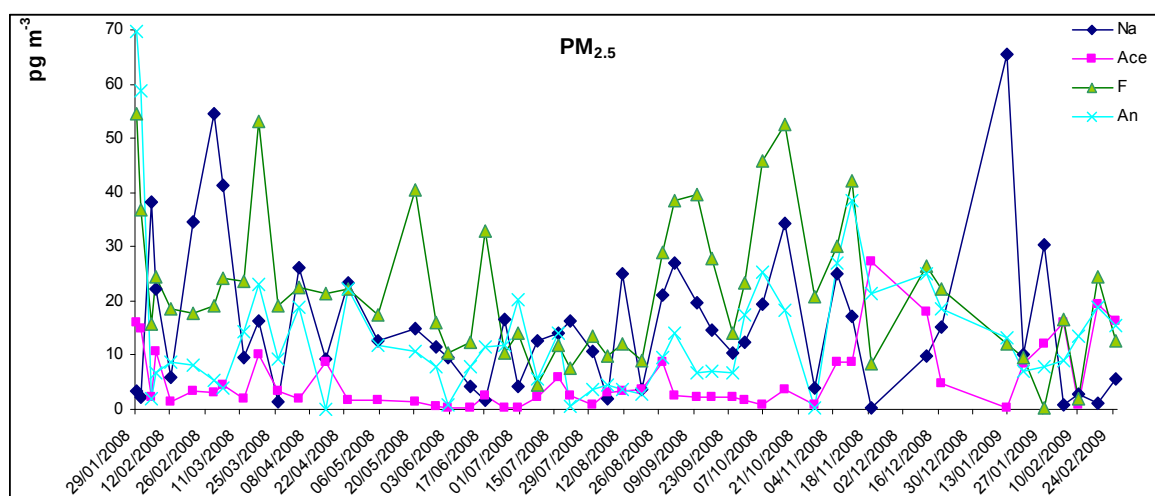


Figura 3.26. Variación anual de los PAH's minoritarios en la fracción PM_{2.5}

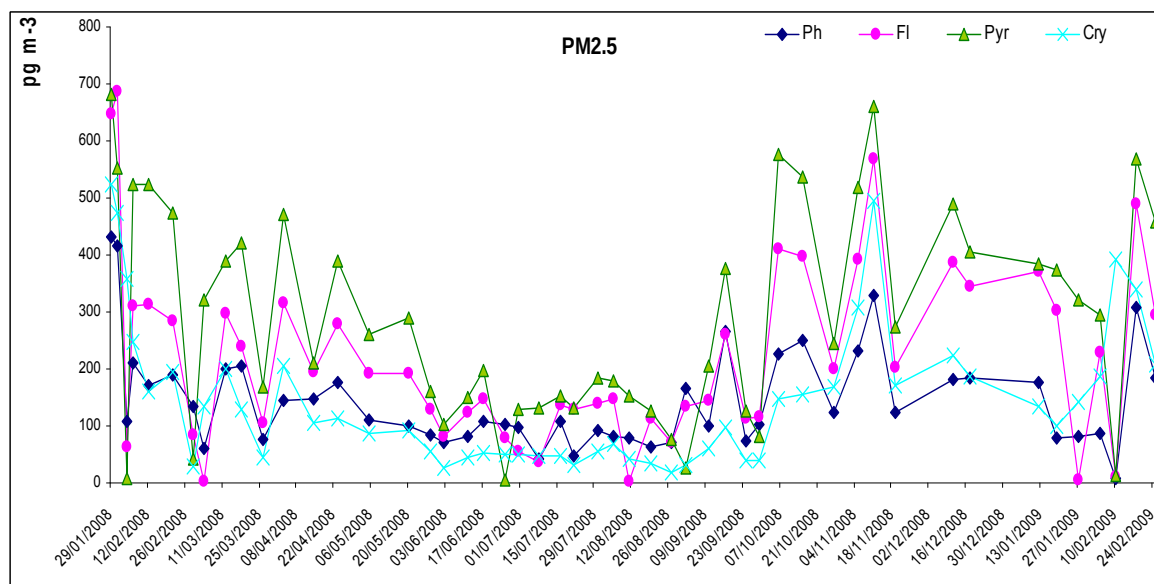


Figura 3.27. Variación anual de los PAH's mayoritarios en la fracción PM_{2.5}

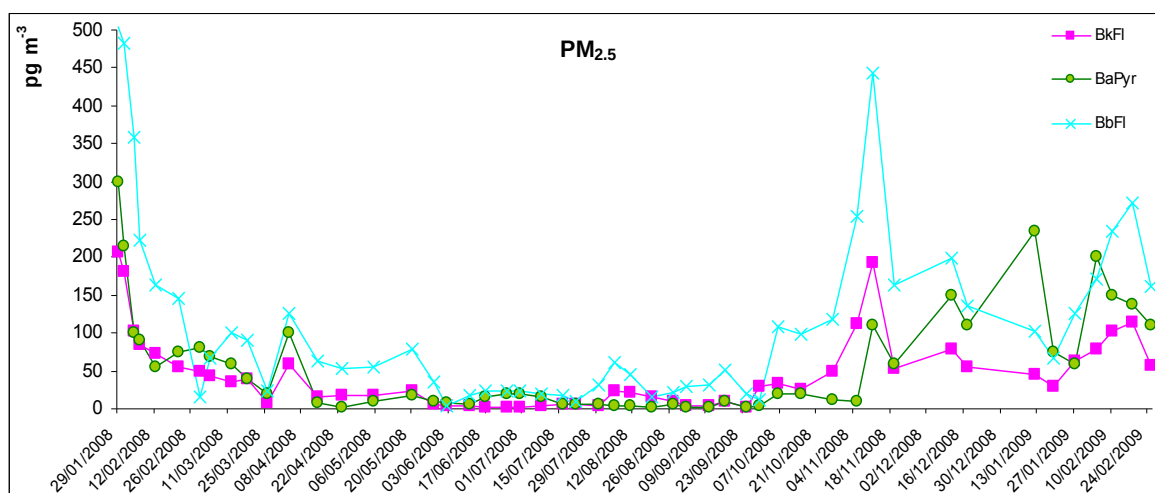


Figura 3.28. Variación anual del resto de los PAH's en la fracción $PM_{2.5}$

Como en la fracción de PM_{10} , los compuestos predominantes en la mayoría de los meses fueron Ph, Pyr, Cry, con máximos de 432, 683 y 523 $pg.m^{-3}$, respectivamente, obtenidos el 29 de enero de 2008, y el Fl con un máximo de 687 obtenido el 31 de enero de 2008. Los mínimos se obtuvieron en los meses estivales, al igual que en la fracción de PM_{10} , así el Ph registró un mínimo de 43 $pg.m^{-3}$ el día 8 de julio de 2008, el Pyr de 6 $pg.m^{-3}$ (25 de junio de 2008) y el Cry de 17 $pg.m^{-3}$ (27 de agosto de 2008).

En la Figura 3.29 se incluye la variación mensual de las concentración de los PAH's agrupados conforme al número de anillos presente en su molécula.

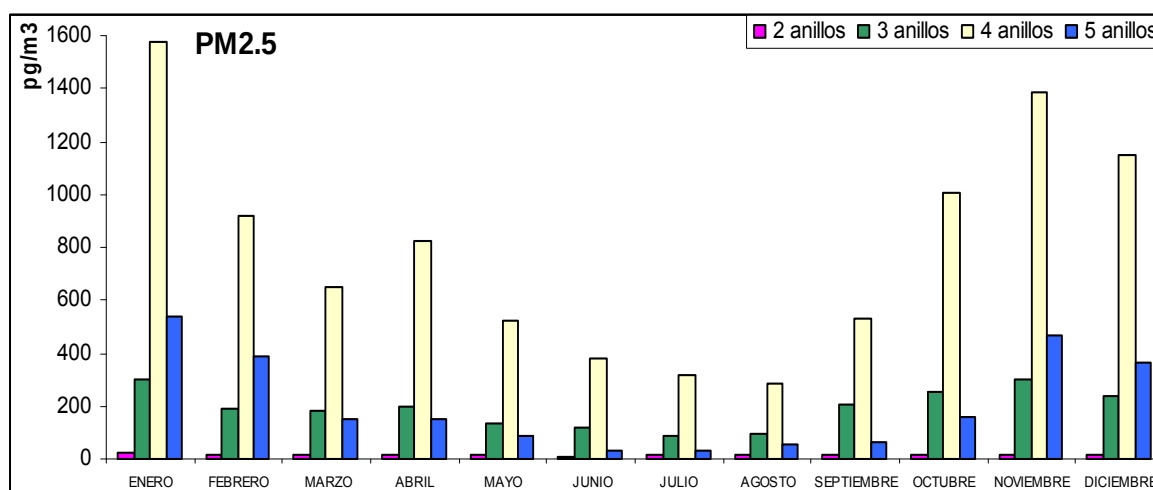


Figura 3.29. Variación estacional de los PAH's en la fracción $PM_{2.5}$

En la Figura 3.30 se representa la suma de las concentraciones de los 12 PAH's estudiados mensualmente, observándose un aumento de los niveles en los meses fríos y la disminución a lo largo de los meses de primavera y verano. Se alcanzaron como suma de concentraciones, entre 6-13 ng.m⁻³ en invierno y 1-4 ng.m⁻³ en verano. Similar al perfil obtenido para PM₁₀, los meses de enero y febrero fueron los que más contribuyeron en las concentraciones de los PAH's.

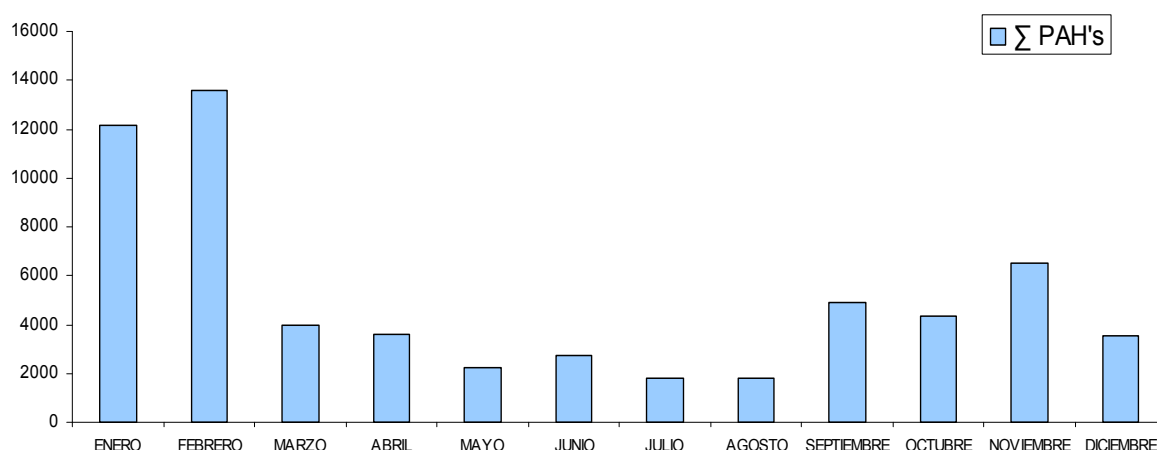


Figura 3.30. Variación mensual de la suma de los PAH's estudiados

En la Tabla 3.17 se muestran las concentraciones promediadas de la suma de concentraciones de los PAH's deducidas para cada una de las cuatro estaciones del año. PM₁₀.

Tabla 3.17. Concentraciones de la suma de los 12 PAH's en las estaciones del año para PM_{2.5}

ng m ⁻³	INVIERNO	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO
MAXIMO DIA	4.4	1.6	0.98	3.2
MINIMO DIA	0.59	0.49	0.32	0.42
PROMEDIO	1.8	0.98	0.49	1.3

OHPAH's

La variación anual obtenida en la fracción PM_{2.5} fue similar a la encontrada en PM₁₀ en cuanto a los mayores niveles de concentración medidos en los meses fríos (Figura 3.31). Respecto a la magnitud de los niveles de concentración obtenidos, el máximo alcanzado fue de 353 pg.m⁻³ para el OHPPh, y de 210 pg m⁻³ para el OHPyr registrados ambos el día 12 de enero de 2009, mientras que los mínimos correspondieron a 12 pg.m⁻³ para el OHPPh (27 de agosto de 2008), y 3 pg.m⁻³ para el OHPyr (26 de marzo de 2008). Estos valores máximos fueron más elevados que los encontrados en PM₁₀, si bien se registraron puntualmente un día

de muestreo, mientras que el resto de las medidas indicaron siempre contenidos más bajos en $PM_{2.5}$.

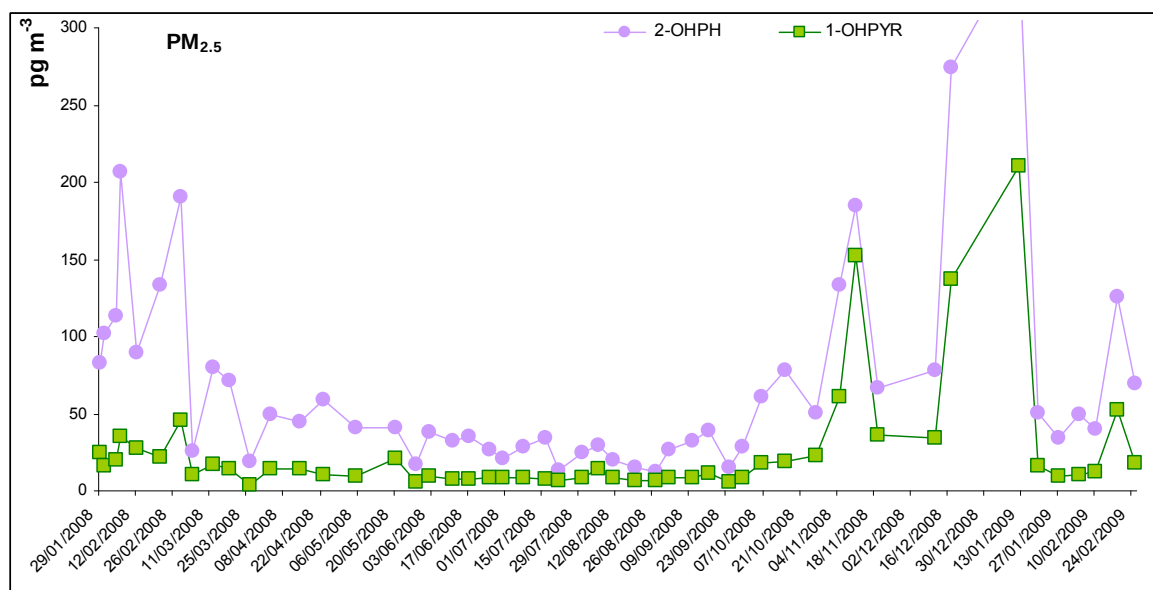


Figura 3.31. Variación anual de los OHPAH's estudiados

La Figura 3.32 representa la variación mensual de las concentraciones promedio de los hidroxilados de interés, mostrando pronunciadas diferencias entre los meses más fríos y calurosos. Así, las concentraciones alcanzadas en diciembre son de aproximadamente 170 y 85 $pg.m^{-3}$, mientras que para el mes de agosto, las concentraciones disminuyen hasta 19 y 9 $pg.m^{-3}$ para el OHPH y el OHPyr respectivamente.

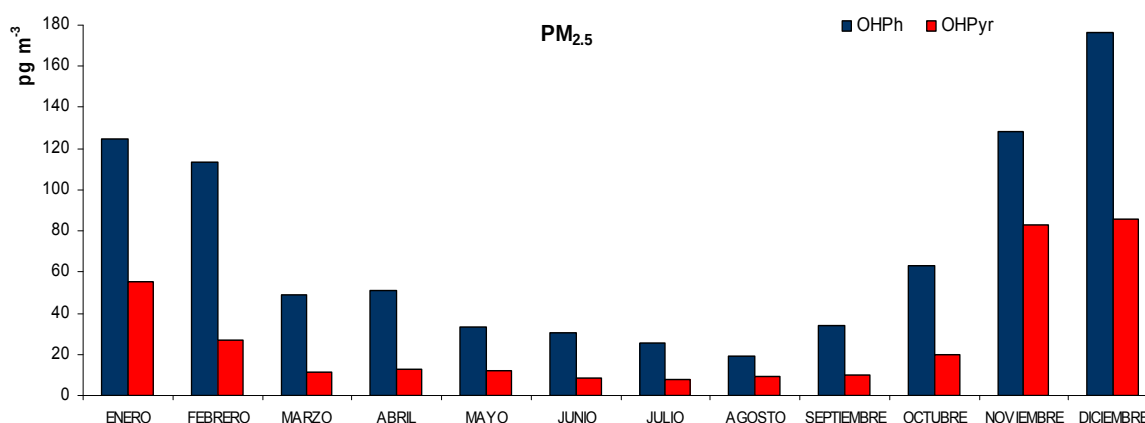


Figura 3.32. Variación estacional de los OHPAH's en $PM_{2.5}$

La suma de los dos compuestos indicó valores máximos de concentración de $1.1\ ng\ m^{-3}$ registrado en febrero y unos mínimos de $0.09\ ng.m^{-3}$ registrado en agosto de 2008 (Figura 3.33)

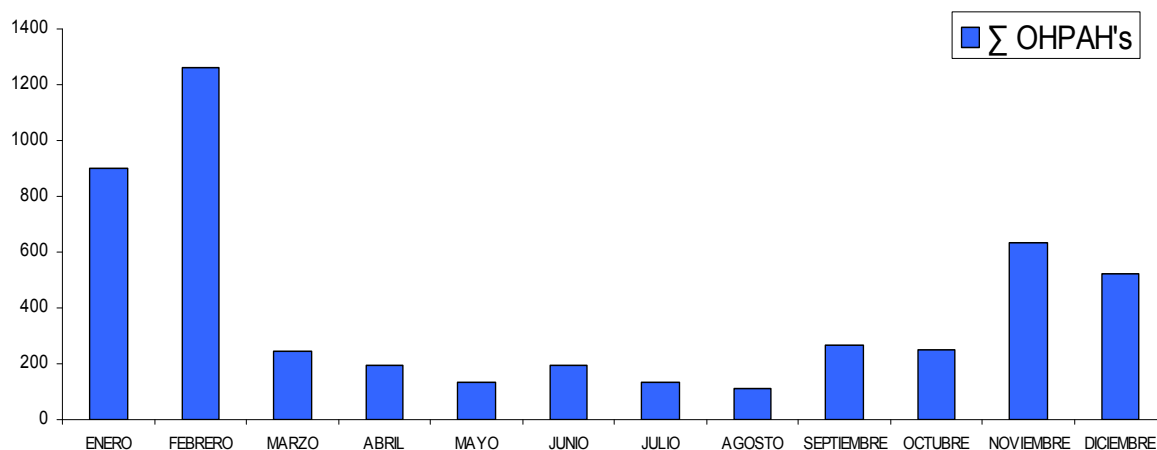


Figura 3.33. Variación mensual de ΣOHPAH's estudiados

En la Tabla 3.18 se muestran los máximos, mínimos y concentraciones promedio de la suma de los dos derivados hidroxilados para las diferentes estaciones del año. Los resultados obtenidos son muy similares a los de la fracción PM₁₀.

Tabla 3.18. Concentraciones la suma de los dos OHPAH's en las diferentes estaciones del año medidos en PM_{2.5}

ng m ⁻³	INVIERNO	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO
MAXIMO DIA	0.56	0.10	0.048	0.34
MINIMO DIA	0.043	0.023	0.019	0.020
PROMEDIO	0.17	0.057	0.034	0.10

3.2.3 RELACIÓN CONCENTRACIÓN MEDIDA DE MATERIAL PARTICULADO/PAC's EN ESTUDIO

Análogamente, se realizaron representaciones mediante diagramas de cajas para estudiar la agrupación de los valores de concentración de los PAC's de interés en función de la concentración de material particulado medido experimentalmente. La Figura 3.34 incluye dichas representaciones.

En el caso de los resultados obtenidos en la fracción PM_{2.5}, se puede apreciar un aumento de los valores medios de los tres tipos de PAC's investigados para contenidos en partículas por encima a 20 µg m⁻³. En el caso de la fracción PM₁₀ esta variación no fue tan evidente, dejando constancia del menor efecto del contenido en material particulado en los niveles de concentración de los compuestos estudiados.

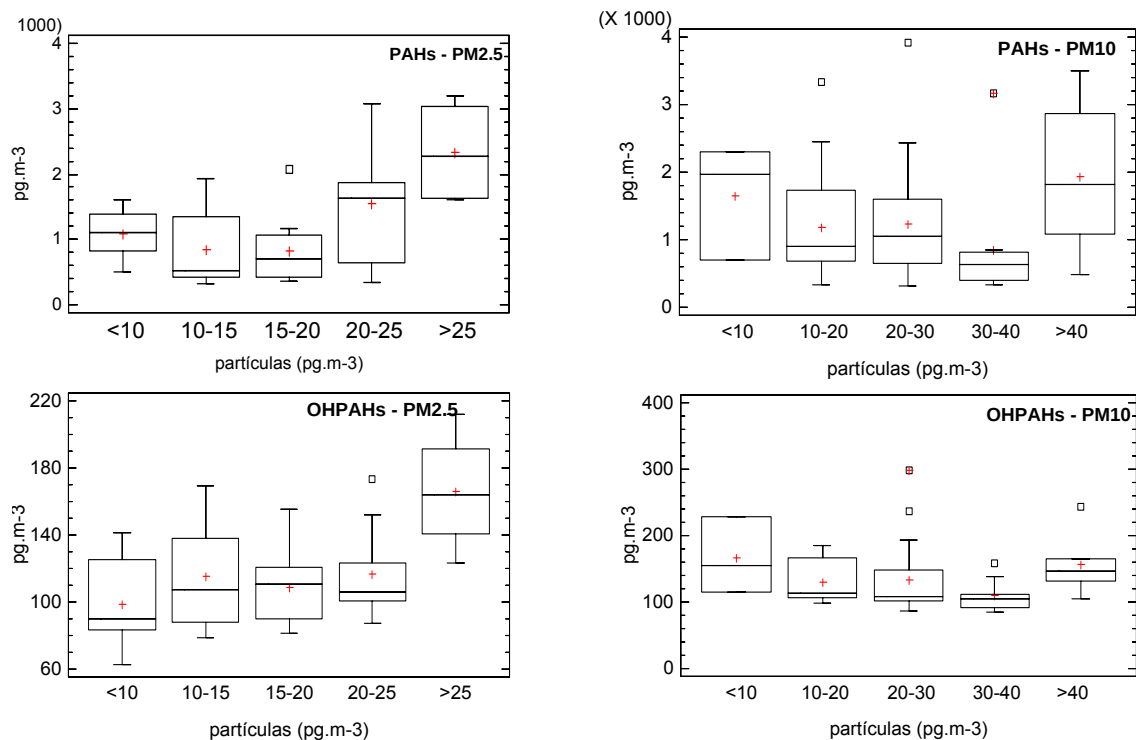


Figura 3.34. Niveles totales de los compuestos policíclicos estudiados en función de la concentración de material particulado

3. CONCLUSIONES

Este trabajo ha consistido fundamentalmente en un estudio de carácter experimental, en el que se ha puesto a punto la metodología analítica mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de fluorescencia para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y dos familias de derivados en aire. Asimismo, esta metodología analítica ha permitido la determinación y caracterización de los niveles de concentración de este tipo de compuestos en el aire ambiente de una zona de Madrid.

Una de las principales novedades de esta Memoria es la identificación de derivados hidroxilados y nitrados, así como su caracterización a lo largo de un año de muestreo, y el estudio de su comportamiento con respecto a los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

1. Se ha desarrollado la **metodología analítica** para el muestreo y determinación cuantitativa de quince compuestos policíclicos aromáticos en aire, mediante el uso de filtros para la toma de muestras y cromatografía líquida de alta resolución con detector de

fluorescencia para la determinación analítica. Se ha validado el método mediante el análisis de materiales de referencia con distintos niveles de concentración y la participación en un ejercicio intercomparativo internacional.

1.1. Para optimizar la **etapa de extracción** de los filtros se evaluaron tres técnicas de extracción sólido-líquido con distintos disolventes orgánicos y mezcla de ellos. La extracción con microondas para PAH's con CH_2Cl_2 presentó las recuperaciones más elevadas, mientras que para los OHPAH's fue la extracción con ultrasonidos a temperaturas bajas con metanol la que proporcionó los mejores resultados. En ninguno de los dos casos hicieron falta posteriores re-extracciones.

1.2. Para optimizar el método de **purificación o "clean-up"** se emplearon dos técnicas de extracción en fase sólida. Ambas proporcionaron resultados satisfactorios, pero al hacer un estudio comparativo entre los análisis de las muestras con/sin etapa previa de purificación no se hallaron diferencias significativas. Asimismo, no se obtuvieron diferencias en cuanto a la cuantificación final de los picos cromatográficos, por lo que se prescindió de la etapa de purificación, lo que supuso una gran simplificación del método, reducción del tiempo necesario para el mismo y reducción en la manipulación de las muestras.

1.3. Se han optimizado las **separaciones cromatográficas** de las tres familias por separado. La mejor resolución cromatográfica para los OHPAH's se consiguió mediante el empleo de acetonitrilo-/agua-acido acético (1%) como fase móvil, obteniéndose incrementos del 10% en la señal analítica, respecto a la fase acuosa.

1.4. Los **límites de detección** del método analítico para los PAH's estuvieron comprendidos entre 2.0-4.0 ng.mL^{-1} para filtros. Para los OHPAH's los límites de detección fueron del orden de 4.0 ng.mL^{-1} para los filtros.

1.5. Para la **validación** de los métodos se llevaron a cabo diferentes estudios mediante análisis de materiales de referencia, participación en ejercicios intercomparativos y comparación de datos espectrales entre disoluciones patrón y extractos de las muestras de interés.

2. Se han aplicado los métodos propuestos para la **caracterización anual** de los compuestos de interés PAH's y OHPAH's en la materia particulada PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$, en una zona

considerada como semi-urbana del área de Madrid. Además se han recogido simultáneamente una serie de datos meteorológicos y físico-químicos de las estaciones de control.

2.1 Se ha llevado a cabo la caracterización anual de los compuestos estudiados. Se han obtenido las concentraciones diarias de 13 PAH's, y 2 OHPAH's presentes en muestras de PM₁₀, PM_{2.5} recogidas un día a la semana de cada mes, entre enero de 2008 y febrero de 2009. En total se recogieron 55 filtros de PM₁₀ y 49 de PM_{2.5}.

2.1.1 **PM₁₀**: Los compuestos mayoritarios de PAH's medidos fueron Ph, Fl, Pyr y Cry, llegando a alcanzar concentraciones superiores a 900 pg.m⁻³. En contra, los PAH's más volátiles (Na, Ace, y F) fueron medidos como minoritarios, alcanzando entre 60 y 100 pg.m⁻³. Finalmente, en relación a los OHPAH's, se alcanzaron máximos de 247 pg.m⁻³ para el OHPh y de 121 pg.m⁻³ para el OHPyr, mientras que los mínimos fueron de 10 pg.m⁻³ para el OHPh y 2 pg.m⁻³ para el OHPyr.

2.1.2 **PM_{2.5}**: Análogamente a PM₁₀, los compuestos predominantes fueron Ph, Pyr, Cry, con máximos de 430, 683 y 520 pg.m⁻³, respectivamente, mientras que los minoritarios (Na, Ace, F, An) no superaron los 70 pg.m⁻³. Finalmente, los niveles de concentración de OHPh estuvieron comprendidos entre 12 y 350 pg.m⁻³ y para el OHPyr, entre 3.0 y 210 pg.m⁻³.

En general, se observó una distribución estacional de las concentraciones medidas con claros incrementos en las mismas durante los meses fríos. Asimismo, las variaciones de los perfiles de concentración entre los derivados y sus hidrocarburos equivalentes fueron similares.

BIBLIOGRAFÍA

- Akyuz, M., Cabuk, H., 2008. Particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmospheric environment of Zonguldak, Turkey. *Science of The Total Environment* 405, 62-70.
- Araki, Y., Tang, N., Ohno, M., Kameda, T., Toriba, A., Hayakawa, K., 2009. Analysis of Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons in Gas/Particle Phases Separately Collected by a High-volume Air Sampler Equipped with a Column Packed with XAD-4 Resin. *Journal of Health Science* 55, 77-85.
- Atkinson, R., Arey, J., 2003. Gas-phase tropospheric chemistry of biogenic volatile organic compounds: a review. *Atmospheric Environment* 37, 197-219.
- Atkinson, R., Arey, J., Zielinska, B., Pitts Jr, J.N., Winer, A.M., 1987. Evidence for the transformation of polycyclic organic matter in the atmosphere. *Atmospheric Environment* 21, 2261-2262.
- Atkinson, R., Pitts, J.N., Winer, A.M., 1983. KINETICS AND MECHANISMS OF SELECTED ATMOSPHERIC REACTIONS INVOLVING NITROGENOUS SPECIES. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 186, 60-ENVR.
- Bacskey, I., Gora, R., Szabo, Z., Kiss, I., Kasicka, V., Peltre, G., Kilar, F., 2008. Seasonal Variations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Air Particulate Extracts. *Chromatographia* 68, S113-S117.
- Callén, M.S., de la Cruz, M.T., López, J.M., Mastral, A.M., 2011. PAH in airborne particulate matter.: Carcinogenic character of PM10 samples and assessment of the energy generation impact. *Fuel Processing Technology* 92, 176-182.
- Callen, M.S., Lopez, J.M., Mastral, A.M., 2010. Characterization of PM10-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air of Spanish urban and rural areas. *Journal of Environmental Monitoring* 13, 319-327.

Fidalgo-Used, N., Blanco-González, E., Sanz-Medel, A., 2007. Sample handling strategies for the determination of persistent trace organic contaminants from biota samples. *Analytica Chimica Acta* 590, 1-16.

Galceran, M.T., Moyano, E., 1995. Determination of hydroxy-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A* 715, 41-48.

Galceran, M.T., Moyano, E., Poza, J.M., 1995. Pentafluorobenzyl derivatives for the gas chromatographic determination of hydroxy-polycyclic aromatic hydrocarbons in urban aerosols. *Journal of Chromatography A* 710, 139-147.

Galceran, M.T., Santos, F.J., Paul, W., Alan, T., Colin, P., 2005. GAS CHROMATOGRAPHY | Environmental Applications, *Encyclopedia of Analytical Science*. Elsevier, Oxford, pp. 129-139.

García Alonso, S.P.P., R.M.; Sevillano Castaño, M.L.; Escolano Segovia, O.; García Frutos, F.J., 2007. Método optimizado para la determinación de PAHs en un suelo contaminado. An optimised method to determine PAHs in a contaminated soil. *Informes técnicos CIEMAT*. 1135-9420.

García, S., 2000. Estudio sobre la determinación de bifenilos policlorados (PCBs) en aire ambiente mediante cromatográfica de gases y caracterización anual en una zona semiurbana del area de Madrid. Tesis, UCM, Madrid.

Harvey, R.G., 1997. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, New York. Wiley-VCH.

He, L.-Y., Hu, M., Huang, X.-F., Zhang, Y.-H., Tang, X.-Y., 2006. Seasonal pollution characteristics of organic compounds in atmospheric fine particles in Beijing. *Science of The Total Environment* 359, 167-176.

Henner, P., Schiavon, M., Morel, J.L., Lichtfouse, E., 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) occurrence and remediation methods. *Analisis* 25, M56-M59.

IARC, 1983. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human. Vol 32, Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data.

IARC, 2008. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human: Air Pollution, Part 1, vol 92, Some Non-Heterocyclic PAHs and related industrial exposures. . 92.

Jongeneelen, F.J., 2001. Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Annals of Occupational Hygiene* 45, 3-13.

Jongeneelen, F.J., Anzion, R.B.M., Leijdekkers, C.M., Bos, R.P., Henderson, P.T., 1985. 1-Hydroxypyrene in human urine after exposure to coal tar and a coal tar derived product. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 57, 47-55.

Jongeneelen, F.J., Anzion, R.B.M., Scheepers, P.T.J., Bos, R.P., Henderson, P.T., Nijenhuis, E.H., Veenstra, S.J., Brouns, R.M.E., Winkes, A., 1988a. 1-HYDROXYPYRENE IN URINE AS A BIOLOGICAL INDICATOR OF EXPOSURE TO POLYCYCLIC AROMATIC-HYDROCARBONS IN SEVERAL WORK ENVIRONMENTS. *Annals of Occupational Hygiene* 32, 35-43.

Jongeneelen, F.J., Bos, R.P., Anzion, R.B.M., Theuws, J.L.G., Henderson, P.T., 1986. BIOLOGICAL MONITORING OF POLYCYCLIC AROMATIC-HYDROCARBONS - METABOLITES IN URINE. *Scandinavian Journal of Work Environment & Health* 12, 137-143.

Jongeneelen, F.J., Bos, R.P., Henderson, P.T., 1988b. METABOLITES OF POLYCYCLIC AROMATIC-HYDROCARBONS IN URINE OF EXPOSED WORKERS. *Toxicological and Environmental Chemistry* 16, 295-307.

Kakimoto, H., Yokoe, H., Matsumoto, Y., Sakai, S., Kanoh, F., Murahashi, T., Akutsu, K., Toriba, A., Kizu, R., Hayakawa, K., 2001. Considerations of atmospheric behaviors of polycyclic aromatic hydrocarbons, nitropolycyclic aromatic hydrocarbons and inorganic pollutants based on their interrelationships. *Journal of Health Science* 47, 385-393.

Khan, Z., Troquet, J., Vachelard, C., 2005. Sample preparation and analytical techniques for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 2, 275-286.

Kishikawa, N., Morita, S., Wada, M., Ohba, Y., Nakashima, K., Kuroda, N., 2004. Determination of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulates by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical Sciences* 20, 129-132.

Liu, L.-b., Liu, Y., Lin, J.-m., Tang, N., Hayakawa, K., Maeda, T., 2007. Development of analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in airborne particulates: A review. *Journal of Environmental Sciences* 19, 1-11.

Mallakin, A., Dixon, D.G., Greenberg, B.M., 2000. Pathway of anthracene modification under simulated solar radiation. *Chemosphere* 40, 1435-1441.

Mattarozzi, M., Musci, M., Careri, M., Mangia, A., Fustinoni, S., Campo, L., Bianchi, F., 2009. A novel headspace solid-phase microextraction method using in situ derivatization and a diethoxydiphenylsilane fibre for the gas chromatography-mass spectrometry determination of urinary hydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Chromatography A* 1216, 5634-5639.

Miet, K., Budzinski, H., Villenave, E., 2009. HETEROGENEOUS REACTIONS OF OH RADICALS WITH PARTICULATE-PYRENE AND 1-NITROPYRENE OF ATMOSPHERIC INTEREST. *Polycyclic Aromatic Compounds* 29, 267-281.

Neilson, A.H., 2000. *Organic Chemicals: An Environmental Perspective*. Lewis Publisher, Boca ratón, New York 2000.

Oukebdane, K., Portet-Koltalo, F., Machour, N., Dionnet, F., Desbène, P.L., 2010. Comparison of hot Soxhlet and accelerated solvent extractions with microwave and supercritical fluid extractions for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitrated derivatives strongly adsorbed on soot collected inside a diesel particulate filter. *Talanta* 82, 227-236.

Portet-Koltalo, F., Oukebdane, K., Dionnet, F., Desbene, P.L., 2008. Optimisation of the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitrated derivatives from diesel particulate matter using microwave-assisted extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390, 389-398.

Portet-Koltalo, F., Oukebdane, K., Dionnet, F., Desbène, P.L., 2009. Optimisation of supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitrated derivatives adsorbed on highly sorptive diesel particulate matter. *Analytica Chimica Acta* 651, 48-56.

Prevedouros, K., Brorström-Lundén, E., J. Halsall, C., Jones, K.C., Lee, R.G.M., Sweetman, A.J., 2004a. Seasonal and long-term trends in atmospheric PAH concentrations: evidence and implications. *Environmental Pollution* 128, 17-27.

Prevedouros, K., Jones, K.C., Sweetman, A.J., 2004b. Modelling the atmospheric fate and seasonality of polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK. *Chemosphere* 56, 195-208.

Ras, M.R., Borrull, F., Marce, R.M., 2009. Pressurised liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from gas and particulate phases of atmospheric samples. *Journal of Separation Science* 32, 1051-1059.

Ravindra, K., Bencs, L., Wauters, E., de Hoog, J., Deutsch, F., Roekens, E., Bleux, N., Berghmans, P., Van Grieken, R., 2006. Seasonal and site-specific variation in vapour and aerosol phase PAHs over Flanders (Belgium) and their relation with anthropogenic activities. *Atmospheric Environment* 40, 771-785.

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, 36-53.

Romanik, G., Gilgenast, E., Przyjazny, A., Kamiński, M., 2007. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70, 253-261.

- Romanoff, L.C., Li, Z., Young, K.J., Blakely, N.C., Patterson, D.G., Sandau, C.D., 2006. Automated solid-phase extraction method for measuring urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in human biomonitoring using isotope-dilution gas chromatography high-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 835, 47-54.
- Rossella, F., Campo, L., Pavanello, S., Kapka, L., Siwinska, E., Fustinoni, S., 2009. Urinary polycyclic aromatic hydrocarbons and monohydroxy metabolites as biomarkers of exposure in coke oven workers. *Occupational and Environmental Medicine* 66, 509-516.
- Saarnio, K., Sillanpää, M., Hillamo, R., Sandell, E., Pennanen, A.S., Salonen, R.O., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in size-segregated particulate matter from six urban sites in Europe. *Atmospheric Environment* 42, 9087-9097.
- Tham, Y.W.F., Takeda, K., Sakugawa, H., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) associated with atmospheric particles in Higashi Hiroshima, Japan: Influence of meteorological conditions and seasonal variations. *Atmospheric Research* 88, 224-233.
- Vione, D., Barra, S., De Gennaro, G., De Rienzo, M., Gilardoni, S., Perrone, M.G., Pozzoli, L., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere: monitoring, sources, sinks and fate. II: Sinks and fate. *Annali Di Chimica* 94, 257-268.
- Wang, G., Kawamura, K., Zhao, X., Li, Q., Dai, Z., Niu, H., 2007. Identification, abundance and seasonal variation of anthropogenic organic aerosols from a mega-city in China. *Atmospheric Environment* 41, 407-416.
- Wang, L., Atkinson, R., Arey, J., 2010. Comparison of Alkylnitronaphthalenes Formed in NO₃ and OH Radical-Initiated Chamber Reactions with those Observed in Ambient Air. *Environmental Science & Technology* 44, 2981-2987.
- Zhang, Y., Yang, B., Gan, J., Liu, C., Shu, X., Shu, J., 2011. Nitration of particle-associated PAHs and their derivatives (nitro-, oxy-, and hydroxy-PAHs) with NO₃ radicals. *Atmospheric Environment* 45, 2515-2521.

Zhang, Y.X., Tao, S., 2008. Seasonal variation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) emissions in China. *Environmental Pollution* 156, 657-663.

Zhou, J., Zhang, X.L., Yu, Z.Q., Wu, M.H., Yang, Z.J., Sheng, G.Y., Fu, J.M., 2009. Characteristics of Urinary Monohydroxy Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Metabolites (OH-PAHs) in Pregnant Women, in: Li, S.C., Wang, Y.J., Cao, F.X., Huang, P., Zhang, Y. (Eds.), *Progress in Environmental Science and Technology*, Vol II, Pts a and B, pp. 2384-2389.

ANEXO I : DATOS EN LA MATERIA PARTICULADA PM₁₀

Parámetros físico-químicos

PAH's

OHPAH's

NPAH's

Muestra	Fecha	T	P	RH	SR	PM2,5	PM10	O3	NO	NO2	N2Ox	SO2	Na	Ace	F	Ph	An	Fl	Pyr	BaAn	Cry	BbFl	BkFl	BaPyr	2-OHPH	1-OHPYR	NNa	3NPh	9NPh	1NPyr	3NFI
1	28/01/2008	9,6	936,2	52,6	136,0	24,9	40,3	8,2	143,9	123,3	267,2	26,0	30,8	9,1	12,6	34,2	55,9	77,6	99,2	120,9	659,6	519,5	217,0	411,6	180,2	83,5	34,7	18,7	22,1	54,1	34,7
3	30/01/2008	8,8	933,7	55,3	124,4	28,0	51,8	10,6	149,2	126,1	275,3	26,4	5,8	12,7	30,3	303,3	33,7	580,0	759,8	306,6	543,9	468,4	195,9	266,4	115,9	66,7	34,3	19,0	21,5	53,5	32,8
6	05/02/2008	7,2	931,8	78,9	124,6	20,6	32,9	12,6	91,6	89,9	181,5	13,7	1,0	17,3	63,3	327,8	31,0	599,0	734,4	242,5	476,0	377,2	148,0	145,1	144,7	43,0	34,0	19,3	20,9	53,0	30,9
8	07/02/2008	12,1	936,7	60,5	146,1	15,9	22,7	18,7	81,5	93,2	174,7	19,6	72,6	18,9	21,0	330,6	9,3	351,3	1,2	10,3	7,0	83,7	118,0	120,8	244,1	13,5	33,6	19,7	20,3	52,4	29,1
10	13/02/2008	8,4	931,1	54,2	91,7	12,1	11,6	39,2	16,3	67,0	83,3	17,7	32,1	1,9	9,1	74,3	6,2	155,7	180,7	80,9	134,4	118,0	50,7	54,1	43,1	17,7	31,2	12,7	14,6	30,4	15,8
11	20/02/2008	11,7	926,6	80,2	80,0	19,4	22,0	12,6	71,3	90,7	161,9	11,5	15,1	8,9	33,5	241,1	23,6	399,0	484,0	231,1	372,6	317,5	137,3	135,6	136,8	44,5	35,7	17,4	28,7	41,9	23,9
13	28/02/2008	12,6	928,2	70,9	111,9	15,4	20,1	15,2	69,6	84,3	153,8	11,4	30,8	11,0	21,8	273,7	0,8	300,3	26,4	21,9	19,9	43,1	0,6	125,0	59,6	16,8	33,6	27,7	13,9	119,2	41,6
15	03/03/2008	14,4	926,0	54,6	178,3	15,8	40,5	28,9	69,9	73,2	143,2	14,6	1,0	3,0	8,6	102,7	12,2	201,2	238,1	157,2	217,4	230,9	84,4	118,9	46,8	14,8	30,4	33,7	14,7	27,0	25,5
17	11/03/2008	15,1	924,1	49,0	165,0	11,2	18,7	40,6	28,7	48,7	77,3	9,0	6,8	4,5	5,4	81,3	11,1	99,7	18,2	1,8	10,6	10,4	0,5	75,6	89,1	29,8	31,3	22,5	20,9	35,0	16,5
19	17/03/2008	13,0	921,2	48,7	161,5	12,3	27,6	34,8	36,6	70,1	106,6	10,8	3,1	0,3	26,7	124,5	9,2	230,6	262,2	90,7	162,5	121,3	55,2	41,2	27,9	7,1	33,4	10,8	21,6	23,6	15,4
21	25/03/2008	12,5	922,1	48,1	184,8	12,0	20,6	38,8	42,8	66,9	109,7	9,9	5,0	1,5	28,2	88,0	8,4	167,4	195,9	45,1	100,7	77,0	29,4	30,2	28,9	8,0	29,5	18,9	11,6	23,0	12,4
23	02/04/2008	16,7	932,4	47,0	220,4	9,1	17,4	34,5	28,3	54,8	83,1	9,7	7,0	1,3	23,0	163,6	27,9	374,6	503,4	478,4	783,8	591,0	131,0	258,9	47,6	24,5	31,4	24,7	37,4	43,8	48,4
26	15/04/2008	14,0	926,8	39,1	224,5	10,6	22,5	42,9	20,9	74,3	95,2	9,6	9,1	4,7	12,0	110,0	11,7	275,1	302,0	125,0	238,0	75,0	75,4	16,9	46,7	17,8	35,7	23,2	15,5	158,7	63,5
27	22/04/2008	13,9	923,9	50,6	240,0	11,7	22,4	42,3	29,3	63,9	93,2	7,5	10,0	5,7	8,1	89,7	9,0	180,9	243,7	49,6	95,7	73,4	25,4	2,4	35,5	8,5	31,8	23,6	13,2	25,9	13,4
29	29/04/2008	14,7	918,4	40,1	264,5	13,0	22,3	53,2	29,0	63,2	92,2	7,7	15,0	2,5	7,8	52,7	5,2	111,6	140,4	19,1	43,4	31,2	10,1	17,2	33,0	1,7	31,6	21,6	15,6	20,3	13,0
31	06/05/2008	22,5	923,3	42,1	198,0	16,0	36,6	40,3	19,1	68,9	88,0	8,3	22,0	7,8	4,9	85,0	7,8	127,1	14,5	0,1	38,7	22,1	13,2	19,0	21,1	8,2	30,2	16,1	13,3	58,9	20,3
32	12/05/2008	17,2	921,0	57,9	175,1	16,0	36,6	40,3	19,1	68,9	88,0	8,3	11,6	10,0	16,4	77,8	8,3	146,2	199,6	30,0	67,1	46,4	15,2	20,0	19,0	4,1	28,3	10,6	20,8	21,1	10,9
34	21/05/2008	17,2	921,0	57,9	175,1	16,8	25,2	23,9	44,8	75,7	120,5	8,4	15,9	5,3	9,9	98,6	8,0	128,9	7,5	52,7	2,0	4,7	14,0	14,7	27,1	6,6	31,4	12,0	12,5	54,9	23,3
36	29/05/2008	15,4	920,6	58,6	194,0	11,1	17,0	45,8	33,4	66,2	99,5	7,8	6,6	0,3	8,4	87,0	11,9	135,1	111,7	11,5	67,0	46,4	13,0	1,2	23,9	5,4	31,6	14,1	21,5	22,9	23,6
38	03/06/2008	18,9	925,7	45,0	247,3	11,6	14,7	56,9	7,2	44,7	51,9	7,1	4,2	0,3	42,8	109,8	11,7	193,9	106,2	51,8	94,2	78,2	24,6	31,7	19,6	5,2	31,5	13,2	21,2	23,1	9,3
40	12/06/2008	20,8	927,1	48,7	272,9	16,0	19,8	53,3	13,1	40,8	53,9	9,3	11,4	2,5	64,2	172,7	20,1	159,8	179,3	36,7	71,0	52,8	17,0	28,7	39,9	6,5	31,2	12,7	23,3	25,4	15,5
42	18/06/2008	22,8	925,4	41,6	315,3	15,3	27,0	45,5	21,3	69,3	90,6	10,1	2,3	0,0	13,3	120,8	5,8	204,9	246,8	41,1	88,4	52,1	16,2	15,3	36,3	6,9	31,4	13,1	13,0	26,3	13,3
44	26/06/2008	28,5	926,2	39,3	304,7	25,8	43,8	58,4	9,4	80,8	90,1	10,5	4,3	0,4	4,9	96,6	14,1	77,1	180,6	32,2	27,5	18,5	17,0	8,8	22,3	6,2	31,8	18,8	13,8	28,1	11,9
46	01/07/2008	28,1	923,9	32,3	305,7	19,8	37,6	54,1	13,1	86,4	99,4	10,9	4,6	2,3	21,7	98,9	15,1	151,1	153,5	23,7	79,3	58,5	15,3	0,6	20,8	6,5	32,5	18,1	15,4	23,4	11,6
48	09/07/2008	26,3	926,0	35,5	307,8	19,6	37,5	35,7	23,6	97,1	120,7	11,2	3,0	6,0	23,4	122,4	9,2	205,1	242,8	46,9	89,2	55,1	16,5	19,7	24,8	7,2	31,3	25,1	17,0	23,6	13,6
50	17/07/2008	25,9	926,1	40,8	282,7	18,6	32,7	54,1	10,4	76,8	87,1	11,0	17,7	2,4	4,9	84,6	8,4	76,2	221,0	40,0	2,8	0,8	13,0	15,4	22,6	6,4	33,8	14,3	15,0	28,7	12,7
52	22/07/2008	27,4	928,0	27,2	301,3	14,2	26,1	68,8	5,2	60,2	65,4	10,2	5,6	0,9	16,1	113,2	7,1	153,6	178,3	35,1	82,8	43,7	11,9	9,1	19,4	5,1	31,3	11,9	12,9	23,4	10,7
54	31/07/2008	27,1	925,4	30,0	283,6	17,0	31,7	40,3	24,5	79,7	104,2	10,8	14,1	3,2	2,9	48,7	11,1	52,2	112,0	33,3	4,2	43,0	12,0	4,6	28,1	6,3	32,5	10,5	13,7	21,1	11,0
56	06/08/2008	29,8	922,0	31,7	266,7	16,2	35,3	45,5	25,4	81,1	106,5	11,4	0,5	3,5	8,7	58,0	28,7	84,0	86,3	19,0	55,4	42,8	12,5	1,7	21,4	5,0	32,9	9,7	13,4	19,7	9,4
58	12/08/2008	24,2	918,3	53,1	260,6	6,7	14,8	32,5	18,1	36,0	54,1	10,2	18,9	3,8	38,8	224,4	42,8	381,3	367,4	154,9	164,2	156,9	81,4	100,0	17,9	4,9	31,5	9,5	24,7	20,8	11,1
60	20/08/2008	24,8	925,0	38,5	268,2	14,4	25,1	53,3	8,1	53,8	61,8	10,4	59,2	8,7	12,6	145,9	7,3	239,4	265,9	55,8	122,9	95,5	33,1	7,9	9,6	3,5	31,7	15,8	13,5	27,1	13,3
62	28/08/2008	27,4	926,2	44,4	228,9	14,6	24,6	43,7	9,5	54,6	64,1	10,7	1,8	2,5	13,3	71,3	1,0	120,3	121,2	19,2	64,0	41,2	12,8	2,8	24,1	5,2	33,9	14,0	12,6	34,3	9,2
64	02/09/2008	24,9	924,5	41,1	229,2	14,9	28,4	28,9	43,3	83,4	126,7	12,3	51,4	2,7	5,4	82,3	5,0	116,2	10,4	2,1	29,3	8,9	0,1	2,0	13,8	4,7	31,8	10,0	12,8	22,9	9,2
66	11/09/2008	22,3	922,5	50,0	217,2	13,7	26,5	22,4	44,5	60,9	105,4	11,8	35,0	9,0	15,4	41,1	25,0	85,3	59,1	10,6	49,4	33,8	10,3	1,6	13,6	4,8	30,6	8,5	15,7	42,7	11,5
68	17/09/2008	22,2	921,3	39,3	217,7	22,3	35,6	20,4	47,4	105,2	152,6	13,2	9,8	8,6	16,9	125,2	14,0	199,9	243,4	27,9	91,6	61,1	20,5	3,7	45,4	6,6	34,9	10,6	13,6	36,2	13,3
70	25/09/2008	17,5	927,2	44,0	200,8	13,9	20,5	47,9	6,6	47,7	54,3	10,7	5,0	8,3	15,0	137,0	16,0	118,0	212,3	23,5	84,3	57,4	19,3	17,7	13,6	5,4	33,3	7,9	14,6	40,7	12,0
72	30/09/2008	18,8	926,5	43,8	191,4	16,3	24,2	44,1	14,4	72,9	87,3	12,1	2,1	8,0	14,8	153,4	14,5	336,9	443,8	80,6	153,2	100,1	32,3	23,0	58,7	6,9	33,5	16,0	13,6	31,7	16,5
74	09/10/2008	14,7	929,1	44,0	166,4	8,3	10,3	40,5	7,1	33,7	40,7	11,3	1,3	7,7	0,8	10,3	17,0	26,3	234,0	68,3	2,2	2,5	31,1	12,0	82,9	16,8	33,6	9,1	15,4	21,0	24,8
76	16/10/2008	18,1	928,7	62,6	136,4	27,3	54,0	8,9	76,3	98,9	175,2	14,6	23,0	7,3	19,3	233,9	26,0	320,7	145,3	13,5	164,7	99,1	29,1	4,9	11,5	4,5	32,5	10,2	13,7	141,7	44,4
77	23/10/2008	12,1	927,7	46,0	95,8	11,4	23,0	41,0	25,3	52,0	77,2	14,6	27,4	6,2	48,0	216,6	23,3	317,2	234,8	134,5	227,5	187,8	72,1	98,6	98,6	21,3	34,4	14,7	40,1	38,7	19,1

ANEXO II : DATOS EN LA MATERIA PARTICULADA PM_{2.5}

ANEXO II : DATOS EN LA MATERIA PARTICULADA PM _{2.5}		Parámetros físico-químicos											PAH's											OH-PAH's			Nitro-PAH's				
Muestra	Fecha	T	P	RH	SR	PM25	PM10	O3	NO	NO ₂	N ₂ O _x	SO ₂	Na	Ace	F	Ph	An	Fl	Pyr	BaAn	Cry	BbFl	BkFl	BaPyr	2-OHPH	1-OHPYR	NNa	3NPh	9NPh	1NPyr	3NFI
2	29/01/2008	8,5	919,9	63,9	136,0	24,9	40,3	8,2	143,9	123,3	267,2	26,0	3,5	15,9	54,5	432,7	69,9	646,4	682,6	319,4	523,2	504,8	207,2	300,0	83,2	25,2	22,8	35,3	57,6	50,1	7,1
4	31/01/2008	9,2	923,3	58,9	124,4	28,0	51,8	10,6	149,2	126,1	275,3	26,4	2,4	14,8	36,9	416,0	58,8	687,5	552,5	302,6	474,4	482,6	180,2	215,0	101,6	16,4	35,7	22,7	20,0	71,0	8,4
5	04/02/2008	8,1	923,4	75,4	88,9	9,0	12,6	31,7	36,9	64,4	101,3	8,8	38,2	2,3	15,7	108,5	1,9	63,3	7,5	237,4	356,7	357,3	102,5	100,0	113,0	19,8	23,0	5,6	9,1	18,3	7,1
7	06/02/2008	9,4	936,5	67,0	146,0	21,7	30,2	14,5	109,3	90,6	200,0	17,8	22,1	10,6	24,5	209,6	6,8	309,3	522,7	112,4	247,2	221,9	85,4	90,0	207,0	34,9	27,9	9,7	15,8	40,0	7,3
9	12/02/2008	9,9	930,2	55,4	114,0	13,9	15,8	38,0	25,0	69,9	95,0	17,2	6,0	1,5	18,5	170,8	8,8	312,5	522,5	115,9	159,6	164,4	72,2	55,0	89,5	27,7	34,3	12,8	12,0	29,8	17,6
12	21/02/2008	12,5	931,6	67,5	150,7	13,7	16,8	16,0	47,7	81,6	129,3	14,2	34,7	3,4	17,8	189,6	8,1	285,5	474,2	91,2	195,1	145,6	55,0	75,0	133,7	22,0	32,1	14,1	42,5	36,0	12,5
14	29/02/2008	13,6	932,1	63,4	148,5	18,9	22,9	14,8	72,8	80,9	153,7	13,1	54,5	3,0	19,1	133,6	5,3	85,0	41,1	67,5	29,6	16,6	50,1	80,0	190,6	45,6	34,0	15,9	17,2	26,4	10,8
16	04/03/2008	10,3	929,2	40,3	199,4	6,2	17,1	47,0	20,4	37,1	57,5	9,3	41,4	4,5	24,3	60,5	3,8	2,0	322,1	42,1	134,0	67,0	43,0	68,0	25,6	10,7	32,2	10,2	12,1	15,7	9,5
18	12/03/2008	15,2	928,2	53,1	160,1	13,7	22,8	25,3	42,3	67,1	109,4	10,6	9,7	2,1	23,7	199,4	14,2	297,0	388,2	23,5	200,3	100,1	35,9	60,0	80,3	17,5	33,4	13,7	14,1	51,0	28,8
20	18/03/2008	10,6	918,2	54,5	179,7	6,6	13,0	47,8	18,7	51,5	70,2	7,5	16,2	10,1	53,2	204,7	23,2	239,8	420,8	68,2	127,7	90,9	38,6	39,0	71,6	14,4	30,0	18,3	20,7	34,0	23,4
22	26/03/2008	11,0	920,7	47,3	139,6	7,2	16,8	55,0	22,1	45,2	67,4	7,6	1,5	3,4	19,2	75,7	9,4	104,9	168,0	16,4	45,5	24,2	7,0	19,0	19,2	3,6	28,9	11,4	17,5	24,0	13,9
24	03/04/2008	18,8	929,3	29,2	224,9	7,8	15,5	50,4	21,8	49,1	70,9	9,0	26,2	2,0	22,6	145,8	18,8	315,0	471,8	113,3	204,4	126,1	59,3	100,0	50,0	14,6	31,8	12,3	33,2	40,7	22,9
25	14/04/2008	12,9	927,8	45,9	231,7	17,9	22,5	41,3	20,5	68,9	89,4	9,6	9,2	8,8	21,2	147,4	0,1	196,0	210,2	30,3	104,8	62,7	16,5	8,0	44,5	13,8	30,4	9,8	11,9	47,9	22,2
28	23/04/2008	16,7	927,8	57,5	230,1	15,1	25,1	23,6	44,3	71,2	115,5	8,5	23,2	1,7	22,3	175,9	22,3	277,7	389,2	52,3	112,7	52,4	18,6	2,0	59,2	10,5	37,4	12,4	28,5	36,3	19,5
30	05/05/2008	21,6	925,4	44,5	228,5	16,1	32,5	44,3	17,5	64,9	82,3	7,7	12,6	1,7	17,3	111,5	11,8	191,9	260,7	39,0	86,1	54,9	18,0	10,0	40,9	9,4	32,4	12,6	28,5	27,7	16,6
33	20/05/2008	16,5	919,8	49,5	208,4	12,9	19,1	34,4	39,0	70,6	109,5	8,3	14,8	1,3	40,6	98,9	10,6	193,4	289,2	42,5	92,4	78,7	22,9	18,0	41,1	20,6	32,0	20,2	23,0	30,5	18,9
35	28/05/2008	14,8	917,5	64,4	156,2	12,4	18,6	38,9	37,5	69,5	107,0	8,0	11,4	0,5	16,1	84,6	7,8	128,9	161,1	20,1	55,9	35,2	5,5	10,0	17,0	5,9	31,4	10,0	18,1	27,6	14,4
37	02/06/2008	17,1	922,3	64,9	217,7	12,8	16,3	30,4	37,7	65,2	102,9	8,1	9,4	0,3	10,3	70,1	0,8	82,5	102,6	1,0	27,0	3,6	4,7	7,0	38,5	9,4	29,6	8,5	15,3	19,5	11,0
39	11/06/2008	19,0	925,2	59,8	202,9	14,0	19,9	57,4	20,7	46,3	67,0	6,8	4,2	0,3	12,3	82,1	7,8	123,4	149,5	14,8	44,8	17,4	3,1	5,0	32,7	7,4	30,1	10,9	19,9	25,6	13,1
41	17/06/2008	19,4	921,7	53,7	240,2	9,4	14,2	37,2	11,2	48,8	60,1	9,2	1,6	2,5	32,9	108,2	11,5	148,0	197,2	21,5	51,7	23,7	2,3	16,0	35,5	7,9	32,6	11,7	39,0	27,0	13,5
43	25/06/2008	26,3	925,7	44,4	305,2	21,4	34,1	61,7	11,4	72,2	83,5	10,0	16,6	0,3	10,3	102,0	11,7	79,6	6,1	5,3	50,0	23,1	2,2	20,0	26,5	8,6	29,0	10,9	16,7	21,0	9,0
45	30/06/2008	28,7	925,1	34,4	305,6	17,5	27,4	72,4	8,0	69,7	77,6	10,4	4,2	0,4	14,2	97,5	20,1	55,3	127,9	1,5	49,5	22,7	2,1	19,0	20,9	8,5	29,4	12,3	14,4	20,5	13,1
47	08/07/2008	23,6	925,3	32,4	277,4	14,1	28,4	47,5	12,3	77,9	90,2	10,6	12,7	2,3	4,6	43,3	5,8	36,1	131,5	1,5	48,0	20,2	4,3	15,0	28,5	8,7	29,1	12,1	13,5	20,8	12,3
49	16/07/2008	24,3	930,1	44,8	213,3	15,0	25,2	50,7	4,4	58,7	63,1	10,5	14,1	6,0	11,8	107,5	14,1	135,6	152,9	1,1	47,1	18,6	6,7	6,0	34,0	7,9	32,0	10,9	14,6	28,8	14,6
51	21/07/2008	28,8	926,0	36,2	288,7	18,0	31,9	66,6	5,9	57,3	63,2	10,5	16,2	2,4	7,7	47,6	0,4	127,7	130,4	8,9	32,6	9,6	6,3	5,0	13,7	6,2	31,8	8,3	12,3	19,7	12,2
53	30/07/2008	27,1	924,4	31,7	293,6	17,8	34,4	37,6	26,0	96,6	122,6	11,2	10,7	0,9	13,4	90,9	3,6	140,2	185,2	20,0	54,4	32,0	4,4	5,0	25,2	8,7	31,2	10,6	16,0	23,2	9,7
55	05/08/2008	31,4	923,5	32,9	271,9	21,3	41,8	39,9	16,2	85,7	101,9	11,5	1,8	3,2	9,9	81,8	4,4	147,9	179,4	33,3	68,4	61,0	22,9	4,5	29,9	14,2	30,4	11,8	14,1	22,0	13,0
57	11/08/2008	27,8	918,4	68,7	452,7	12,9	25,1	42,9	17,7	52,4	70,1	10,2	25,1	3,5	12,2	78,2	3,6	3,1	153,0	24,8	43,0	46,0	22,4	3,0	20,1	8,5	37,1	9,2	12,4	16,3	9,7
59	19/08/2008	25,5	922,7	33,6	268,3	15,8	26,1	47,9	25,1	64,7	89,8	11,3	3,8	3,8	8,9	62,5	2,8	113,0	125,5	11,4	35,5	14,8	16,2	1,5	15,1	6,5	30,9	8,7	11,4	20,6	9,8
61	27/08/2008	27,0	926,6	48,2	207,6	17,4	32,1	48,5	6,6	38,4	45,0	10,4	21,1	8,7	28,9	70,7	9,5	71,6	76,2	22,6	17,8	21,4	10,1	5,0	12,4	6,4	31,4	12,7	12,3	22,0	12,6
63	01/09/2008	24,7	926,7	44,7	246,6	14,4	26,6	38,4	20,8	73,4	94,1	11,0	26,9	2,5	38,7	164,8	14,1	134,4	25,1	23,6	32,8	29,0	3,9	2,5	26,5	8,4	31,6	11,3	13,3	84,3	29,4
65	10/09/2008	22,2	924,9	61,1	208,8	20,3	46,6	13,7	49,8	70,7	120,6	12,1	19,6	2,2	39,7	100,6	6,6	144,1	205,5	23,5	59,5	31,2	3,6	2,0	32,9	9,0	33,0	10,3	24,1	25,3	14,3
67	16/09/2008	22,1	921,9	33,9	224,3	16,9	23,6	27,2	28,5	91,6	120,1	11,9	14,6	2,1	27,8	265,8	7,1	260,1	377,3	39,1	97,7	51,2	10,0	10,0	39,3	11,6	36,0	13,2	23,4	32,1	13,9
69	24/09/2008	18,5	922,9	42,0	199,4	12,7	12,3	50,3	3,8																						

