

Trabajo Fin de Grado

Facultad de Ciencias Experimentales



Grado en Química

Determinación de PAHs en aguas residuales mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de alta resolución

Determination of PAHs in wastewater by gas chromatography coupled to high resolution mass spectrometry

Adelaida Magaña Ramírez
Curso académico 2018-2019
13/09/2019

Tutores:
Francisco Javier Arrebola Liébanas
Irene Domínguez Pérez
Departamento de Química y Física

Determinación de PAHs en aguas residuales mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de alta resolución

Memoria del Trabajo Fin de Grado en Química presentada por
Adelaida Magaña Ramírez

Almería, 13 de septiembre de 2019

Fdo.: Adelaida Magaña Ramírez

*“La ciencia es bella
y es por esa belleza
que debemos trabajar en ella,
y quizás, algún día,
un descubrimiento científico como la radio,
puede llegar a beneficiar
a toda la humanidad”.*

Marie Curie

MEMORIA

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. ABSTRACT	5
3. INTRODUCCIÓN	6
3.1. NORMATIVAS SOBRE AGUAS RESIDUALES	7
3.2. SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES	8
3.2.1. Tratamiento primario de aguas residuales	9
3.2.2. Tratamiento secundario de aguas residuales	10
3.2.3. Tratamiento terciario de aguas residuales	11
3.3. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	11
3.4. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EMPLEADAS ANTERIORMENTE PARA LA DETERMINACION DE PAHs EN AGUAS RESIDUALES	18
4. OBJETIVOS	19
5. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS	19
5.1. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN	19
5.2. ANÁLISIS MEDIANTE GC-HRMS CON ANALIZADOR ORBITRAP	21
5.3. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1. MATERIALES	25
6.2. EQUIPO	25
6.3. REACTIVOS	26
6.4. CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS	26
6.5. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN	26
6.6. ANALISIS CROMATOGRÁFICO	27
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
7.1. OPTIMIZACIÓN DEL METODO GC-HRMS	27
7.2. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN	35
7.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	36
7.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES	40
8. CONCLUSIONES	42
9. BIBLIOGRAFÍA	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores máximos permitidos en el vertido de aguas residuales industriales a sistemas públicos	8
Tabla 2. Propiedades físico-químicas de naftaleno y acenaftileno	12
Tabla 3 Propiedades físico-químicas de acenafteno y fluoreno.....	13
Tabla 4. Propiedades físico-químicas de fenantreno y antraceno	13
Tabla 5. Propiedades físico-químicas de fluoranteno y pireno	14
Tabla 6. Propiedades físico-químicas de benzo[a]antraceno y criseno	14
Tabla 7. Propiedades físico-químicas de benzo[b]fluoranteno y benzo[a]pireno.....	15
Tabla 8. Propiedades físico-químicas del indeno[123-cd]pireno y benzo[ghi]perileno	15
Tabla 9. Propiedades físico-químicas del dibenzo [ah] antraceno.....	16
Tabla 10. Valores límite expresados en $\mu\text{g/L}$ de PAHs en aguas costeras y superficiales	16
Tabla 11. Concentraciones máximas admisibles en aguas superficiales según la Directiva 2013/39/UE	17
Tabla 12. Parámetros espectrométricas obtenidos experimentalmente para los PAHs objeto de estudio	33
Tabla 13. Rangos lineales de las rectas de calibrado para cada compuesto con su respectivo coeficiente de determinación (R^2)	37
Tabla 14. Parámetros de validación del método analítico	39
Tabla 15. Concentraciones de naftaleno, acenafteno y fenantreno encontradas en el análisis de muestras reales, indicando también el tratamiento de reciclado al que se ha sometido cada muestra.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del proceso de tratamiento de aguas residuales ⁵	9
Figura 2 Sistema SPME de Supelco ³¹	20
Figura 3. Esquema de los pasos de extracción para HS-SPME(a) y para DI-SPME (b) ³²	21
Figura 4. Esquema de las partes de un cromatógrafo de gases ³⁵	22
Figura 5. Inyector en modo Split (1) e inyector en modo splitless (2) ³⁶	22
Figura 6. Esquema de un espectrómetro de masas ³⁷	23
Figura 7. Analizador Orbitrap ³⁹	24
Figura 8. Pico cromatográfico correspondiente al naftaleno en una disolución de $5\mu\text{g/L}$ con su correspondiente espectro de masas.....	28
Figura 9. Pico cromatográfico correspondiente al acenaftileno (izquierda) en una disolución de $5\mu\text{g/L}$ con su correspondiente espectro de masas. El pico de la derecha corresponde a acenafteno, que ha sido satisfactoriamente separado	28
Figura 10. Pico cromatográfico correspondiente al acenafteno en una disolución de $5\mu\text{g/L}$ con su correspondiente espectro de masas.....	28
Figura 11. Pico cromatográfico correspondiente al fluoreno en una disolución de $5\mu\text{g/L}$ con su correspondiente espectro de masas.....	29
Figura 12. Pico cromatográfico correspondiente al fenantreno (izquierda) en una disolución de $5\mu\text{g/L}$ con su correspondiente espectro de masas. El pico de la derecha	

corresponde a antraceno, que posee el mismo ion característico y ha sido satisfactoriamente separado. 29

Figura 13. Pico cromatográfico correspondiente al antraceno (derecha) en una disolución de 5µg/L con su correspondiente espectro de masas. El pico de la izquierda corresponde a fenantreno, que posee el mismo ion característico y ha sido satisfactoriamente separado. 29

Figura 14. Pico cromatográfico correspondiente al fluoranteno en una disolución de 5µg/L con su correspondiente espectro de masas 30

Figura 15. Pico cromatográfico correspondiente al pireno en una disolución de 5µg/L con su correspondiente espectro de masas..... 30

Figura 16. Pico cromatográfico correspondiente al benzo[a]antraceno (izquierda) en una disolución de 5µg/L con su correspondiente espectro de masas. El pico de la derecha corresponde a criseno, que posee el mismo ion característico y que ha sido satisfactoriamente separado 30

Figura 17. Pico cromatográfico correspondiente al Criseno (derecha) en una disolución de 5µg/L con su correspondiente espectro de masas. El pico de la izquierda corresponde a benzo[a]antraceno, que posee el mismo ion característico y que ha sido satisfactoriamente separado 31

Figura 18. Pico cromatográfico correspondiente al benzo[b]fluoranteno en una disolución de 5µg/L con su correspondiente espectro de masas. El pico de la derecha corresponde a benzo[a]pireno, que posee el mismo ion característico y que ha sido satisfactoriamente separado 31

Figura 19. Pico cromatográfico correspondiente al benzo[a]pireno (derecha) en una disolución de 5µg/L con su correspondiente espectro de masas. El pico de la izquierda corresponde a benzo[b]fluoranteno, que posee el mismo ion característico y que ha sido satisfactoriamente separado..... 31

Figura 20. Pico cromatográfico correspondiente al indeno[123-cd]pireno (izquierda) en una disolución de 5µg/L con su correspondiente espectro de masas. El pico de la derecha corresponde a dibenzo[ah]antraceno, que posee el mismo ion característico y que ha sido satisfactoriamente separado 32

Figura 21. Pico cromatográfico correspondiente al dibenzo[ah]antraceno (derecha) en una disolución de 5µg/L con su correspondiente espectro de masas. El pico de la izquierda corresponde a Indeno[123-cd]pireno, que posee el mismo ion característico y que ha sido satisfactoriamente separado 32

Figura 22. Pico cromatográfico correspondiente al benzo[ghi]perileno en una disolución de 5µg/L con su correspondiente espectro de masa. 32

Figura 23. Recta de calibrado del compuesto dibenzo[ah]antraceno cuando se llevó a cabo la preparación de muestras fortificadas de concentraciones conocidas sin la adición de acetona..... 36

Figura 24. Recta de calibrado del primer rango lineal de trabajo del indeno[123-cd]pireno 38

Figura 25. Recta de calibrado del segundo rango lineal de trabajo del indeno[123-cd]pireno 38

Figura 26. Pico correspondiente al naftaleno, tras la monitorización de su ión característico (128.06205) encontrado en el análisis de la muestra S5, junto con su espectro de masas..... 40

1. RESUMEN

En este estudio se ha llevado a cabo la determinación de 15 contaminantes en aguas residuales. Estos contaminantes son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), que son considerados sustancias prioritarias. Para ello se usó la técnica de microextracción en fase sólida de espacio cabeza (HS-SPME) junto a la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (GC-HRMS) usando un analizador Orbitrap. Tras la optimización de la metodología, se llevó a cabo el estudio de los diferentes parámetros de validación (linealidad, veracidad, precisión y límite de cuantificación). La metodología propuesta permite, de forma completamente automatizada, llevar a cabo el análisis de PAHs en aguas residuales sin ningún tipo de tratamiento previo. Los resultados de la validación fueron satisfactorios, ya que todos los parámetros se encontraban dentro de los límites establecidos por la guía SANTE. Los bajos límites de cuantificación (1 y 5 ng/L) ponen de manifiesto la elevada sensibilidad de la metodología desarrollada. Finalmente, ésta se aplicó a 26 muestras reales de aguas residuales (influentes y efluentes), encontrando naftaleno en 16 de ellas, fenantreno en 7 y acenafteno en 1. En conclusión, la metodología utilizada ha demostrado ser eficaz para el análisis de PAHs en aguas residuales.

Palabras clave: *PAHs, HS-SPME, GC-HRMS, Orbitrap*

2. ABSTRACT

In this study the determination of 15 pollutants in wastewater samples was addressed. These pollutants are polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), which are considered as priority substances. For it, headspace solid phase microextraction (HS-SPME) was used in combination with gas chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (GC-HRMS) by using an Orbitrap analyzer. After the methodology was optimized, different validation parameters were studied (linearity, trueness, precision and limit of quantification). The proposed methodology allows for the fully automated determination of PAHs in wastewaters without previous treatment. The validation results were satisfactory since all the evaluated parameters were considered adequate according to SANTE guide requirements. The low quantification limits (1 y 5 ng/L) highlight the high sensitivity of the developed methodology. Finally, it was applied to 26 wastewaters, finding naphthalene in 16, phenanthrene in 7 and acenaphthene in 1 of the analyzed samples. In conclusion, the methodology used has proven to be effective for analyzing PAHs in wastewaters.

Keywords: *PAHs, HS-SPME, GC-HRMS, Orbitrap*

3. INTRODUCCIÓN

A lo largo de los años, la preocupación por el medio ambiente y la preservación del mismo ha ido en aumento. Hemos ido tomando conciencia de lo importante que es cuidar nuestro planeta, pues es nuestro futuro⁰.

Uno de los recursos más importante del que disponemos es el agua, pero esta no está al alcance de todo el mundo en unas condiciones favorables. Recientes estudios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) afirman que 3 de cada 10 personas no tiene a su alcance agua potable⁰. Por ello es muy importante hacer un uso responsable de ella, además de reciclarla para poder utilizarla con otros fines en los que no son necesarias aguas de una alta calidad. Existen numerosas ventajas del reciclado de aguas residuales:

- El reciclaje de agua favorece al medio ambiente, pues a la larga evita que se elimine agua de hábitats naturales como son embalses, ríos, lagos y pantanos, lo que permite conservar la diversidad biológica que habita en ellos.
- La reutilización de las aguas residuales, permite una minimización del uso del agua potable lo que permite que futuras generaciones puedan también hacer uso de este recurso.

Por todo ello, en la actualidad, la reutilización de aguas residuales está cada vez más en tendencia, para así hacer un mayor aprovechamiento de los recursos hídricos del planeta. Esta técnica es utilizada ya en la mayoría de países desarrollados.

En 1958, el Consejo Económico y Social de las Naciones Unidas, defendió la utilización de los recursos hídricos de mayor calidad en casos donde realmente esta sea necesaria. De esta manera, se usarían las aguas residuales para fines que toleren una calidad menor. Las aguas residuales son tratadas en plantas específicas donde se lleva a cabo su transformación para su posterior reutilización.

Aunque los usos de estas aguas son muy diversos, predomina la utilización para todo tipo de riegos y para la recarga artificial de acuíferos. Entre los usos más comunes se encuentran el riego agrícola (cultivos, invernaderos, cosechas), el riego público (parques, jardines, cementerios), la recarga artificial de acuíferos, el uso industrial (refrigeración) y el uso urbano (aires acondicionados, limpieza de coches, apagado de incendios). Aunque siempre existen ciertas limitaciones, pues si no se lleva a cabo un buen tratamiento de las aguas, puede causar efectos negativos sobre los cultivos o sobre la salud.

La utilización de aguas recicladas para riego muchas veces no requiere un nivel de calidad tan alto, por lo que el nivel de depuración puede ser más bajo. Esto permite un ahorro en fertilizantes ya que estas aguas proporcionan un aporte continuo de nutrientes a los cultivos, además de ser más económicas.

Para la recarga de acuíferos, aun no se ha determinado cual es el nivel óptimo de calidad para estas aguas, si se debe tratar hasta el punto que al adicionarla no afecte a los usos del agua subterránea o si debe tratarse hasta que la calidad sea óptima para el consumo humano.

En todos los casos, la ley prohíbe la reutilización de aguas residuales para el consumo humano.

En julio de 2007 se aprobó el Real Decreto 1620/2007 donde se nombra a las aguas residuales reutilizadas como aguas regeneradas, y se establecen unos criterios mínimos de calidad que son de obligado cumplimiento dependiendo del posterior uso que se le vaya a dar al agua².

Actualmente, el uso de aguas regeneradas está prohibido para el consumo humano, la industria alimentaria, el uso hospitalario, el agua de baño, las torres de refrigeración y condensadores evaporativos, además de cualquier otro uso que pueda afectar a la salud pública o al medio ambiente.

3.1. NORMATIVAS SOBRE AGUAS RESIDUALES

Para poder hacer uso de las aguas residuales es necesario tratarlas y depurarlas, ya que las aguas no tratadas pueden tener contaminantes como bacterias y virus, lo que representaría un riesgo para la salud pública. Además, contienen otros compuestos como nitrógeno y fósforo, que favorecen el crecimiento de las algas y estas a su vez, si se encuentran en exceso, pueden provocar la asfixia de las otras formas de vida.

El 21 de mayo de 1991 se publicó la Directiva 91/271/CE, donde se establecía como obligatoria la depuración de aguas residuales urbanas. A partir del año 2005, todas las poblaciones mayores de 2.000 habitantes debían contar con una planta de reciclaje de aguas acorde con el volumen de vertido producido por ellos³.

Como ya hemos mencionado antes, uno de los principales usos de las aguas residuales tratadas es el riego agrícola, por lo que las industrias agroalimentarias necesitan establecer unos requisitos mínimos de calidad de las aguas.

La industria agroalimentaria consume alrededor de un 70% del agua dulce del planeta en la producción de materias primas, el procesado de alimentos y los procesos de limpieza. Por ello, actualmente, es primordial el uso de aguas recicladas ya que cada vez es mayor la escasez del agua dulce del planeta.

Aunque esta práctica está extendida por muchos países de la Unión Europea, no existía una normativa común dentro del marco europeo para la gestión de las aguas residuales. Los diferentes países han marcado sus límites y directrices, pero existen grandes divergencias en los usos, los parámetros y los valores máximos permitidos. A la larga, esto supone un impedimento para la comercialización de productos agrícolas, pues cada país tiene establecidos sus niveles, y lo que es suficiente para unos para otros no lo es.

Para normalizar estos criterios, la UE solicitó al centro Joint Research Centre (JRC) una propuesta de requisitos mínimos de calidad y seguridad para las aguas residuales tratadas, quien publicó un informe donde establecía valores límite de parámetros microbiológicos y fisicoquímicos.

En 2002, se aprobó la Ley 5/2002⁴, sobre vertidos de aguas residuales industriales a los sistemas públicos de saneamiento donde se establecen valores máximos para diferentes parámetros, como se puede ver en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores máximos permitidos en el vertido de aguas residuales industriales a sistemas públicos

Parámetro	Valor máximo
pH	6-9
Sólidos en suspensión	1000 mg/L
Materia sedimentable	10 mL/L
DBO ₅	1000 mg/L
DQO	1600 mg/L
Aceites y grasas	100 mg/L
Sulfuro	2 mg/L

3.2. SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Debido a la fuerte demanda a nivel europeo, han ido surgiendo multitud de plantas de tratamiento de aguas residuales, que reciben el nombre de EDAR (estación de depuración de aguas residuales).

Se considera aguas residuales a aquellas aguas usadas que provienen de viviendas, servicios industriales, sanitarios o agrícolas, las cuales son retiradas por medio público o privado a los distintos medios receptores. El principal objetivo de la depuración es reducir los contaminantes para transformar el agua residual en un agua de calidad.

Cuando el agua llega a la EDAR, pasa por diferentes etapas, en las que se van realizando distintos tipos de tratamientos, tal y como puede observarse en la Figura 1. Estos tratamientos son:

- **Tratamiento preliminar:** En este tratamiento se regula y mide el caudal de agua que entra en la planta. También se procede a remover los posibles sólidos de gran tamaño, las grasas y las arenas. A través de un proceso de filtración, se eliminan estos componentes. A veces también se produce un aireado, para de esta forma eliminar algunos componentes volátiles y oxigenar el agua.
- **Tratamiento primario:** El objetivo de este tratamiento es eliminar el resto de sólido en suspensión, lo que se lleva a cabo por un proceso de sedimentación por gravedad o bien por medio de sustancias químicas, tales como aluminio, polielectrolitos floculantes o sales de hierro. Todo el proceso se lleva a cabo mediante maquinaria hidráulica.
- **Tratamiento secundario:** La finalidad de este tratamiento es la eliminación de la materia orgánica que se presenta en forma de coloides y en disolución, todo ello por un proceso de oxidación. Este tratamiento además se divide en procesos aeróbicos, anaeróbicos y fisicoquímicos.

- **Tratamiento terciario:** En éste se alcanza el nivel de calidad requerido para el agua, ya que se trata de la etapa final, en la que se procede a la eliminación de agentes patógenos y nutrientes.

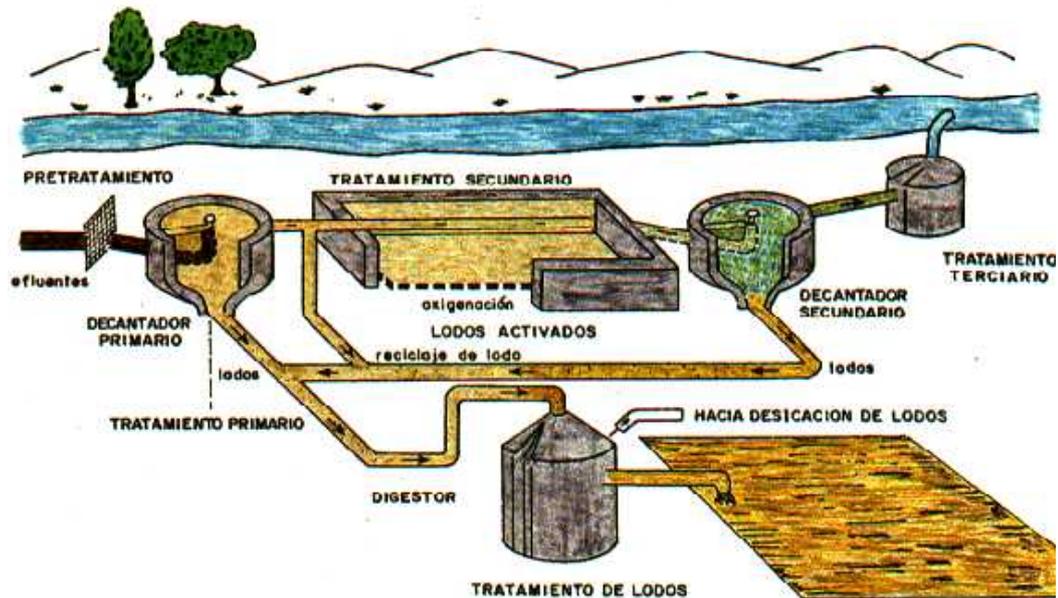


Figura 1. Esquema del proceso de tratamiento de aguas residuales⁵

3.2.1. Tratamiento primario de aguas residuales

El primer tratamiento que se lleva a cabo es mediante métodos físico-químicos, aplicados con el fin de reducir la contaminación, pero sobre todo para eliminar el mayor número posible de partículas en suspensión que pueda contener el agua. Estas partículas pueden ser partículas flotantes que se encuentran en la superficie o partículas sedimentables, que se depositan al fondo del tanque. Por ello se utilizan tanto sistemas de filtros, que se emplean para extraer los sólidos gruesos, como sistemas de flotación, que se utilizan para eliminar compuestos por aire o gas disuelto. Los métodos más utilizados de tratamiento primario son:

- **Sedimentación:** Se lleva a cabo en unos tanques llamados decantadores. Con esta técnica se puede eliminar hasta un 40% de los sólidos que contiene el agua residual y se basa en la caída de las partículas al fondo por acción de la gravedad.
- **Flotación:** Se lleva a cabo en tanques llamados flotadores y se basa en la baja densidad de algunos compuestos del agua como las grasas, los aceites y las espumas, que se encuentran formando una capa en la superficie del agua. Para eliminar otras partículas que también son de baja densidad pero que no se encuentran en esta capa, se inyectan burbujas de aire que hacen que estas otras partículas asciendan. Con esta técnica se logra eliminar hasta un 75% de las partículas suspendidas.
- **Neutralización:** Se basa en normalizar el pH del agua, es decir, añadir sustancias ácidas o alcalinas para lograr un pH comprendido entre 6 y 8.5⁶.

- **Tanque Imhoff:** Consiste en dos cámaras, una de sedimentación y una de digestión. Después del tratamiento preliminar, el agua entra en la cámara de sedimentación donde se depositan los sólidos que caen por una ranura a la cámara de digestión, donde se producen reacciones anaeróbicas. El agua pasa a otra etapa del tratamiento. Este tanque es utilizado para el tratamiento primario⁷.
- **Macrófitas flotantes:** Consiste en una estructura flotante de macrófitas. Esto crea una red de raíces que se entrelazan y forman un tapiz filtrante⁸.

3.2.2. Tratamiento secundario de aguas residuales

El segundo tratamiento se lleva a cabo por métodos biológicos, con el objetivo de eliminar toda la materia orgánica no deseada que se encuentra en el agua residual. Este trabajo lo llevan a cabo determinados microorganismos y bacterias, que transforman la materia orgánica en biomasa celular, gases, energía y agua. Este tratamiento consigue hasta un 90% de eficacia. Existen dos tipos de procesos en los tratamientos secundarios:

- **Aeróbico:** Son procesos realizados en presencia de oxígeno. En ellos se produce la degradación de la materia orgánica y, se forma CO₂ y agua. Mediante este proceso se lleva a cabo la eliminación del nitrógeno.
- **Anaeróbicos:** Son procesos realizados en ausencia de oxígeno y entre los que destaca la fermentación donde la materia orgánica es degradada en energía, CO₂ y metano.

Los procesos más comunes de tratamiento secundario son:

- **Cultivo de microalgas:** Es un tratamiento secundario del tipo aeróbico. Las microalgas utilizadas son heterótrofas, es decir se alimentan de materia orgánica y no necesitan luz para crecer. De esta forma utilizan el carbono orgánico, compuestos de nitrógeno y compuestos de fósforo presentes en el agua residual, como fuente de carbono y energía, sin necesidad de aporte solar para la realización de la fotosíntesis. La biomasa creada es reutilizada luego como combustible⁹.
- **Filtros de lecho bacteriano:** Es un tratamiento secundario en condiciones aeróbicas. El agua se hace pasar por un tanque con un relleno formado por bacterias, las cuales van digiriendo la materia orgánica del agua residual. A continuación, el agua tratada pasa por una etapa final de decantación, para eliminar posibles trazas de relleno bacteriano que hayan podido ser arrastradas por el agua¹⁰.
- **Lagunas aireadas:** Consiste en un reactor aerobio, que contiene aireadores mecánicos que mantienen los organismos orgánicos en suspensión para que así se produzca una degradación orgánica mayor. El efluente que sale de este tratamiento se utiliza mayormente para rellenar acuíferos¹¹.
- **Aireación prolongada:** El agua a tratar se introduce en un reactor biológico, donde hay una gran cantidad de bacterias en suspensión, que producen la degradación biológica de los componentes gracias a unas turbinas. Es un proceso aeróbico¹².
- **Humedal bioelectrogénico:** El agua residual llega a un tanque de depuración sin ninguna fuente de energía, que está formado por un lecho de bacterias y un material electroconductor. Esto permite tratar alrededor de 25000 litros de agua residual. Por último, se procede a un tratamiento de electrodesinfección para eliminar los patógenos¹³.

- **Sistema de biorreactor de membrana:** Es la combinación de dos tratamientos, uno primario y uno secundario, pues consiste en una degradación biológica y una filtración por membrana, que separa los sólidos en suspensión y los microorganismos encargados de la degradación de la materia orgánica¹⁴.

3.2.3. Tratamiento terciario de aguas residuales

Como ya se ha comentado anteriormente, la finalidad de este tratamiento es eliminar la materia orgánica que no ha sido eliminada mediante los tratamientos anteriores. Se lleva a cabo mediante procesos de naturaleza biológica o físico-químicos, siendo estos últimos los más utilizados. El proceso más común de tratamiento terciario consta de una etapa inicial de coagulación-floculación y finalmente una decantación.

Otros procesos de tratamiento terciario son:

- **Intercambio iónico:** se utiliza un material llamado resinas de intercambio iónico que retiene selectivamente los iones que se encuentran disueltos en agua.
- **Adsorción:** Consiste en la retención de moléculas solubles en la superficie de un sólido.
- **Microfiltración y ultrafiltración:** se basan en el principio de separación física.
- **Electrodesinfección:** Consiste en la utilización de ánodos que producen oxidantes como el cloro y el ozono.
- **Humedales artificiales:** Son sistemas donde se producen procesos de eliminación de contaminantes con el mismo procedimiento que se hace en humedales naturales, es decir, haciendo pasar el agua por un sustrato filtrante, donde quedan retenidos los constituyentes del agua residual¹⁵.

Frecuentemente, estos tratamientos no son suficientes para eliminar todos los contaminantes que se encuentran en las aguas residuales, y que es importante eliminar pues puede ser altamente perjudiciales para la salud. Por ello, se realizan estudios para medir el nivel de contaminantes que quedan después de los tratamientos realizados en las EDAR.

3.3. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, PAHs) son compuestos orgánicos cuya principal característica es que presentan dos o más anillos aromáticos condensados junto con otros anillos no aromáticos.

Estos compuestos normalmente se encuentran en estado sólido. Dado que vamos a estudiar su presencia en aguas residuales, un dato importante es la solubilidad que tienen en agua. Esta solubilidad en agua es muy baja y disminuye con forme aumenta el peso molecular, es decir, cuanto más grande sea la molécula de PAHs, menos soluble en agua es¹⁶. Los valores de solubilidad para cada compuesto se pueden ver en las Tablas 2 a 9. Sin embargo, sí que son solubles en disolventes orgánicos, por lo que se puede decir que son lipofílicos¹⁷.

La formación de estos compuestos se debe principalmente a la combustión incompleta de la materia orgánica, por lo que su presencia en el medio acuático puede

deberse a fenómenos naturales como los incendios o las erupciones volcánicas, pero en su mayoría son derivados de procesos realizados por el ser humano¹⁸.

Los PAHs suelen encontrarse disueltos en agua, lo que es poco frecuente dada su baja solubilidad, o adsorbidos a partículas sólidas orgánicas e inorgánicas en suspensión¹⁹, lo que es muy común en aguas residuales. Estos compuestos son bioacumulables y persistentes, llegando a ser mutagénicos y cancerígenos²⁰. Es muy importante realizar estudios para su identificación, pues pueden permanecer años en el medio ambiente, dañando medios acuáticos y terrestres.

Su toxicidad varía en función del tamaño, la forma y los sustituyentes que pueda presentar la molécula. Los PAHs que presentan menor peso molecular son absorbidos en mayor medida por los humanos. Una vez absorbidos, se distribuyen por todos los órganos incluso atravesando la placenta en caso de mujeres embarazadas. A la hora de metabolizarlos, éstos compuestos se pueden transformar en moléculas polares que pueden eliminarse a través de la orina o las heces, o bien pueden transformarse en metabolitos muy reactivos, que se unen al ADN y pueden causar cáncer y mutaciones²¹.

La agencia internacional para la investigación del cáncer, clasificó los PAHs en cuatro grupos según su toxicidad. Llamó grupo 1 a los que son cancerígenos para el humano, grupo 2A a los que son probablemente cancerígenos para el humano, grupo 2B a los posiblemente cancerígenos para el ser humano y grupo 3 a los que no son cancerígenos para el ser humano²².

En este trabajo se han determinado 15 hidrocarburos aromáticos policíclicos cuyos nombre, estructuras y propiedades físico-químicas se muestran en las Tablas 2 a 9.

Tabla 2. Propiedades físico-químicas de naftaleno y acenaftileno

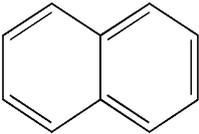
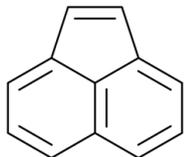
Nombre común	Naftaleno	Nombre común	Acenaftileno
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₈	Fórmula molecular	C ₁₂ H ₈
			
Masa molecular (g/mol)	128.18	Masa molecular (g/mol)	152.196
Apariencia	Sólido blanco	Apariencia	Cristales amarillos
Punto de fusión	80 °C	Punto de fusión	91.8 °C
Solubilidad en agua (a 25°C) (mg/L)	30	Solubilidad en agua (a 25°C) (mg/L)	3.93
Coefficiente de reparto octanol/agua (logP_{ow})	3.37	Coefficiente de reparto octanol/agua (logP_{ow})	4.07
Grupo de toxicidad²¹	2B	Grupo de toxicidad²¹	3

Tabla 3 Propiedades físico-químicas de acenafteno y fluoreno

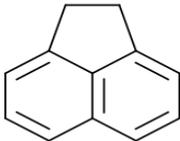
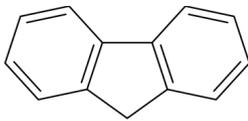
Nombre común	Acenafteno	Nombre común	Fluoreno
Fórmula molecular	C ₁₂ H ₁₀	Fórmula molecular	C ₁₃ H ₁₀
			
Masa molecular (g/mol)	154.2	Masa molecular (g/mol)	166.22
Apariencia	Cristales blancos	Apariencia	Polvo beige
Punto de fusión	95 °C	Punto de fusión	112-116 °C
Solubilidad en agua (a 25°C) (mg/L)	3.47	Solubilidad en agua (a 25°C) (mg/L)	1.98
Coefficiente de reparto octanol/agua (logP_{ow})	3.92	Coefficiente de reparto octanol/agua (logP_{ow})	4.18
Grupo de toxicidad²¹	3	Grupo de toxicidad²¹	3

Tabla 4. Propiedades físico-químicas de fenantreno y antraceno

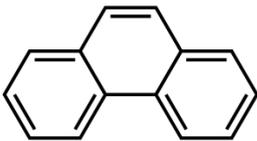
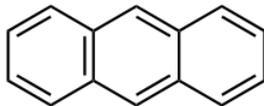
Nombre común	Fenantreno	Nombre común	Antraceno
Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₀	Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₀
			
Masa molecular (g/mol)	178.23	Masa molecular (g/mol)	178.23
Apariencia	Polvo blanco	Apariencia	Polvo amarillo
Punto de fusión	101 °C	Punto de fusión	215-218 °C
Solubilidad en agua (a 25°C) (mg/L)	1.29	Solubilidad en agua (a 25°C) (mg/L)	0.07
Coefficiente de reparto octanol/agua (logP_{ow})	4.45	Coefficiente de reparto octanol/agua (logP_{ow})	4.45
Grupo de toxicidad²¹	3	Grupo de toxicidad²¹	3

Tabla 5. Propiedades físico-químicas de fluoranteno y pireno

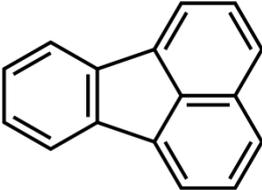
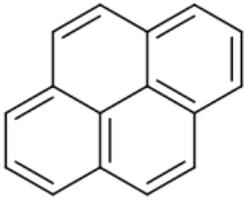
Nombre común	Fluoranteno	Nombre común	Pireno
Fórmula molecular	C ₁₆ H ₁₀ 	Fórmula molecular	C ₁₆ H ₁₀ 
Masa molecular (g/mol)	202.26	Masa molecular (g/mol)	202.26
Apariencia	Sólido incoloro	Apariencia	Sólido incoloro
Punto de fusión	111 °C	Punto de fusión	148-150 °C
Solubilidad en agua (a 25°C) (mg/L)	0.26	Solubilidad en agua (a 25°C) (mg/L)	0.14
Coefficiente de reparto octanol/agua (logP _{ow})	4.90	Coefficiente de reparto octanol/agua (logP _{ow})	4.88
Grupo de toxicidad ²¹	3	Grupo de toxicidad ²¹	3

Tabla 6. Propiedades físico-químicas de benzo[a]antraceno y criseno

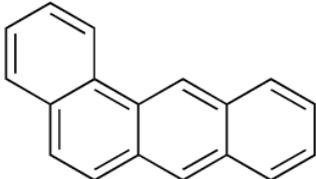
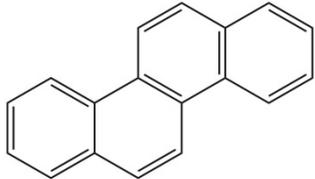
Nombre común	Benzo[a]antraceno	Nombre común	Criseno
Fórmula molecular	C ₁₈ H ₁₂ 	Fórmula molecular	C ₁₈ H ₁₂ 
Masa molecular (g/mol)	228.3	Masa molecular (g/mol)	228.3
Apariencia	Polvo fluorescente	Apariencia	Cristales beige
Punto de fusión	162 °C	Punto de fusión	254-256 °C
Solubilidad en agua (a 25°C) (mg/L)	0.0038	Solubilidad en agua (a 25°C) (mg/L)	0.002
Coefficiente de reparto octanol/agua (logP _{ow})	5.61	Coefficiente de reparto octanol/agua (logP _{ow})	5.56
Grupo de toxicidad ²¹	2B	Grupo de toxicidad ²¹	2B

Tabla 7. Propiedades físico-químicas de benzo[b]fluoranteno y benzo[a]pireno

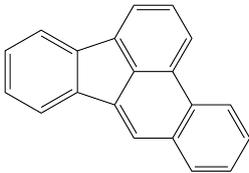
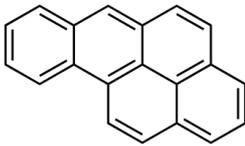
Nombre común	Benzo[b]fluoranteno	Nombre común	Benzo[a]pireno
Fórmula molecular	C ₂₀ H ₁₂	Fórmula molecular	C ₂₀ H ₁₂
			
Masa molecular (g/mol)	252.3	Masa molecular (g/mol)	252.3
Apariencia	Cristales incoloros	Apariencia	Cristales amarillos
Punto de fusión	168 °C	Punto de fusión	178.1 °C
Solubilidad en agua (a 25°C) (mg/L)	0.0012	Solubilidad en agua (a 25°C) (mg/L)	0.0038
Coefficiente de reparto octanol/agua (logP_{ow})	6.04	Coefficiente de reparto octanol/agua (logP_{ow})	6.06
Grupo de toxicidad²¹	2B	Grupo de toxicidad²¹	1

Tabla 8. Propiedades físico-químicas del indeno[123-cd]pireno y benzo[ghi]perileno

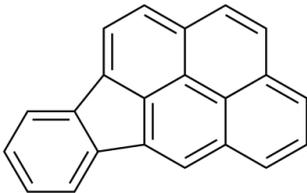
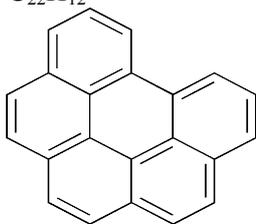
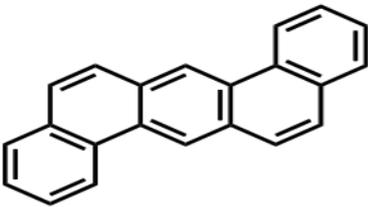
Nombre común	Indeno[123-cd]pireno	Nombre común	Benzo[ghi]perileno
Fórmula molecular	C ₂₂ H ₁₂	Fórmula molecular	C ₂₂ H ₁₂
			
Masa molecular (g/mol)	278.33	Masa molecular (g/mol)	276.33
Apariencia	Cristales amarillos	Apariencia	Solido amarillo
Punto de fusión	164 °C	Punto de fusión	276-280 °C
Solubilidad en agua (a 25°C) (mg/L)	0.062	Solubilidad en agua (a 25°C) (mg/L)	0.00026
Coefficiente de reparto octanol/agua (logP_{ow})	6.58	Coefficiente de reparto octanol/agua (logP_{ow})	6.50
Grupo de toxicidad²¹	2B	Grupo de toxicidad²¹	3

Tabla 9. Propiedades físico-químicas del dibenzo [ah] antraceno

Nombre común	Dibenzo[ah]antraceno
Fórmula molecular	C ₂₂ H ₁₄
	
Masa molecular (g/mol)	278.36
Apariencia	Polvo incoloro
Punto de fusión	267 °C
Solubilidad en agua (a 25°C) (mg/L)	0.0005
Coefficiente de reparto octanol/agua (logP _{ow})	6.84
Grupo de toxicidad ²¹	2 ^a

Según lo aprobado en el boletín oficial de la Junta de Andalucía los valores máximos de PAHs permitidos en aguas residuales son los que se muestran en la Tabla 10²³.

Tabla 10. Valores límite expresados en µg/L de PAHs en aguas costeras y superficiales

Compuesto	Valor límite (µg/L)	
	Aguas costeras	Aguas superficiales
Antraceno	3	1
Fluoranteno	200	60
Benzo[a]pireno	1,5	0.5
Benzo[b]fluoranteno	0.9	0.3
Benzo[ghi]perileno	0.9	0.3
Indeno[123-cd]pireno	0.06	0.02
Naftaleno	60	20

Los 15 PAHs objeto de estudio se encuentran en la lista de sustancias prioritarias en aguas superficiales establecida por la Directiva Marco del agua (*Water Framework Directive*, WFD) de UE en la Directiva 2013/39/UE²⁴. Estos se consideran como sustancias peligrosas prioritarias, de ahí la importancia de este estudio. En la Tabla 11, se muestra las normas de calidad ambiental (*Environmental Quality Standards*, EQS) para algunos de los PAHs.

Tabla 11. Concentraciones máximas admisibles en aguas superficiales según la Directiva 2013/39/UE

Compuesto	CMA (µg/L)	
	Aguas superficiales continentales	Otras aguas superficiales
Alacloro	0.7	0.7
Antraceno	0.1	0.1
Atrazina	2.0	2.0
Benceno	50	50
Difeniléteres bromados	0.14	0.014
Cloroalcanos	1.4	1.4
Clorfenvinfós	0.3	0.3
Clorpirifós	0.1	0.1
Diurón	1.8	1.8
Endosulfán	0.01	0.004
Fluoranteno	0.12	0.12
Hexaclorobenceno	0.05	0.05
Hexaclorobutadieno	0.6	0.6
Hexaclorociclohexano	0.04	0.02
Isopruturón	1,0	1,0
Plomo y sus compuestos	14	14
Mercurio y sus compuestos	0.07	0.07
Níquel y sus compuestos	34	34
Nonilfenoles	2.0	2.0
Pentaclorofenol	1.0	1.0
Benzo[a]pireno	0.27	0.027
Benzo[b]fluoranteno	0.017	0.017
Benzo[k]fluoranteno	0.017	0.017
Benzo[ghi]perileno	8.2 ⁻³	8.2 ⁴
Naftaleno	130	130
Simazina	4.0	4.0
Compuestos de tributilestaño	0.0015	0.0015
Ácido perfluorooctnosufónico	36	7.2

Quinoxifeno	2.7	0.54
Aclonifeno	0.12	0.012
Bifenox	0.04	0.004
Cibutrina	0.016	0.016
Cipermetrina	6 ⁻⁴	6 ⁻⁵
Diclorvós	7 ⁻⁴	7 ⁻⁵
Hexabromociclododecano	0.5	0.05
Heptacloro y epóxido de heptacloro	3 ⁻⁴	3 ⁻⁵
Terbutrina	0.34	0.034

3.4. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EMPLEADAS ANTERIORMENTE PARA LA DETERMINACION DE PAHs EN AGUAS RESIDUALES

Se han desarrollado numerosos métodos para la determinación de PAHs en aguas residuales y también otros estudios que analizan los efectos de las aguas residuales en la agricultura.

En 2007, *Ming-Chi et al.*²⁵ desarrolló un método de detección de PAHs en muestras acuosas. El disolvente utilizado fue acetona. La extracción se llevó a cabo mediante una microextracción en fase sólida asistida por microondas, a 145 W durante 30 minutos. A continuación, se llevó a cabo el análisis mediante cromatografía de gases, con un inyector split/splitless, acoplada a un detector de ionización de llama (*Flame Ionization Detector*, FID). Se obtuvieron unos buenos resultados, con límites de detección (*Limit Of Detection*, LOD) en el rango de 1-0.03 µg/L y con unas recuperaciones aceptables desde el punto de vista de la guía SANTE, entre 85-103%. Además, la desviación estándar relativa (*Relative Standard Deviation*, RSD) que muestra la precisión del método también fue buena, siendo la RSD inferior a un 17%.

En 2016 *Rey et al.*²⁶ optimizaron una metodología para la determinación de PAHs en aguas residuales y vertidos. Como método de extracción se utilizó la extracción en fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE) con cartuchos rellenos de un compuesto polimérico apolar. La elución de los compuestos se llevó a cabo mediante el empleo de acetonitrilo. La disolución estándar de PAHs se encontraba preparada en isopropanol. El análisis se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) y la detección de los analitos mediante fluorescencia, con la excepción de acenaftileno, para el cual se empleó un detector de diodo Array, ya que éste no emite fluorescencia. Los resultados obtenidos fueron aceptables según los criterios establecidos por la guía SANTE, con recuperaciones entre 86-116% y una precisión buena, con RSD menor de 15.7%. Los LOD resultaron entre 0.1-2 ng/L.

En otro estudio realizado en 2017 por *Juanjuan et al.*²⁷, se desarrolló una fibra de carbono (*Carbon Fiber*, CF) rellena de óxido de grafeno (*Graphene Oxide*, GO) mediante deposición electroforética, para realizar la determinación de PAHs en aguas residuales mediante microextracción en fase sólida (*Solid Phase Microextraction*, SPME). Con este tipo de fibra GO-CF se obtuvieron mejores rendimientos. El análisis

se llevó a cabo mediante HPLC, obteniendo amplios rangos lineales (0.01-50 µg/L) y LODs en el rango de 0.001-0.004 µg/L. Los valores de repetitividad obtenidos fueron buenos (RSD <9%).

Además, también se ha realizado estudios sobre la presencia de los PAHs en suelos agrícolas cuando las aguas residuales son utilizadas como medio de riego. Un ejemplo es el estudio realizado por *Tao et al.*²⁸, en el que realizaban el análisis de muestras de 10g de suelo utilizando el método de extracción acelerada con disolventes con una mezcla de acetona y diclorometano 1:1. A continuación, llevaban a cabo una etapa de limpieza en una columna de sílice con una mezcla de pentano y diclorometano 3:2. Por último analizaban la muestra mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas empleando la ionización electrónica. Se obtuvieron LOD entre $5.5 \cdot 10^{-4}$ - $1.8 \cdot 10^{-5}$ mg/kg y las recuperaciones entre 57-140% con unos valores de precisión buenos (RSD <5.57%).

4. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es el desarrollo, validación y aplicación de un método analítico para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en aguas residuales mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (GC-HRMS). Las actividades que se han llevado a cabo son las siguientes:

- Desarrollo de un nuevo método analítico mediante la optimización del GC-HRMS y del método de extracción.
- Validación del método mediante el cálculo de la linealidad, rango de trabajo, la veracidad, la precisión intradía e interdía y el límite de cuantificación.
- Aplicación del método en el análisis de 26 muestras reales de aguas residuales procedentes de diferentes plantas de tratamiento situadas en Andalucía.

5. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS

Las concentraciones en muestras reales de los compuestos con los que se han trabajado son del orden de ppb (µg/L) y ppt (ng/L), por lo que son necesarios métodos instrumentales avanzados. Además, al ser concentraciones tan pequeñas, se requiere del uso de equipos con una alta sensibilidad y selectividad, para poder alcanzar ese nivel de cuantificación. Por ello, y a fin de alcanzar la sensibilidad necesaria, debe combinarse una técnica de extracción y una técnica de determinación instrumental selectivas y sensibles.

5.1. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

Existen numerosas técnicas analíticas de extracción. La elección de este método depende de la naturaleza de los analitos objeto de estudio, así como su matriz. La técnica escogida debe ser capaz de aislar adecuadamente el analito, eliminando toda posible interferencia y ajustando los analitos a los requerimientos del siguiente paso de determinación.

Una de las técnicas más empleada es la extracción sólido-líquido o líquido-líquido, donde la muestra se somete a un proceso de agitación con un disolvente orgánico, para de esta forma extraer los analitos. Con esta técnica se obtienen buenos resultados de

recuperación además de su rapidez y sencillez²⁹. El inconveniente de esta técnica es el gran desecho de disolventes orgánicos que produce, los errores que pueden cometerse en etapas de transferencia y el laborioso lavado al que se tiene que someter el material de vidrio utilizado. Por ello, hoy día se persigue la implementación de técnicas con una mayor automatización.

Otra de las técnicas más empleadas y además bastante utilizada en el análisis de aguas residuales, es la SPE. Consiste en el paso de la muestra por un cartucho que contiene un material sólido en el que quedan absorbidos los analitos y posteriormente son eluidos en función de la afinidad con el material sólido y la fase móvil, que puede ser un líquido o un gas.

A lo largo de los años se han ido desarrollando otras técnicas miniaturizadas, que no produjeran grandes desechos de disolventes orgánicos y además que fueran simples, rápidas y no muy costosas. Entre ellas cabe destacar la SPME, la dispersión en matriz de fase sólida (*Matrix Solid-Phase Dispersion*, MSPD) y la extracción por sorción por barras magnéticas agitadoras (*Stir Bar Sorptive Extraction*, SBSE)³⁰.

La SPME ha ganado mucha fama en las últimas décadas. Fue desarrollada por Belardi y Pawliszyn en 1989³⁰ y es la técnica de extracción utilizada en este trabajo. Este método de extracción permite realizar los procesos de preconcentración, extracción e inserción de la muestra en el cromatógrafo de forma completamente automatizada. Esta técnica es de gran utilidad para compuestos que son muy volátiles, cosa que otras técnicas no son capaces de conseguir, y también resulta de utilidad para compuestos semivolátiles. La SPME hace uso de una fibra de sílice que está recubierta por una capa de extracto adsorbente polimérico que permite la extracción de los compuestos. Este material es resistente a altas temperaturas. En la Figura 2 se muestran las diferentes partes de un sistema de SPME.



Figura 2 Sistema SPME de Supelco³¹

La extracción por medio de SPME tiene lugar en dos etapas: partición de los analitos entre la muestra y el revestimiento de la fibra, y la desorción térmica de los analitos hacia el cromatógrafo. La primera etapa se puede dar de dos formas³²:

- **Técnica de espacio cabeza (*Headspace*, HS-SPME):** En ella los analitos son extraídos indirectamente de la matriz. La fibra se expone a la fase de vapor en equilibrio con la muestra y así se extraen los analitos. La agitación de la muestra facilita la extracción. Las ventajas de esta forma de extracción es que se eliminan las interferencias, la sensibilidad es más alta y la fibra tiene una vida útil mayor, ya que no entra en contacto directo con la matriz. La desventaja que tiene es que no es efectiva con analitos de baja volatilidad.
- **Técnica de inmersión directa (*Direct Immersion*, DI-SPME):** En ella los analitos son extraídos directamente de la matriz mediante la introducción de la fibra en la muestra, de forma que los analitos se transfieren de la matriz a la fase extractante. Para facilitar la difusión de los analitos y la rapidez de la extracción se agita durante el proceso.

En la Figura 3 podemos ver un esquema con la diferencia entre la técnica de espacio cabeza y la de inmersión directa.

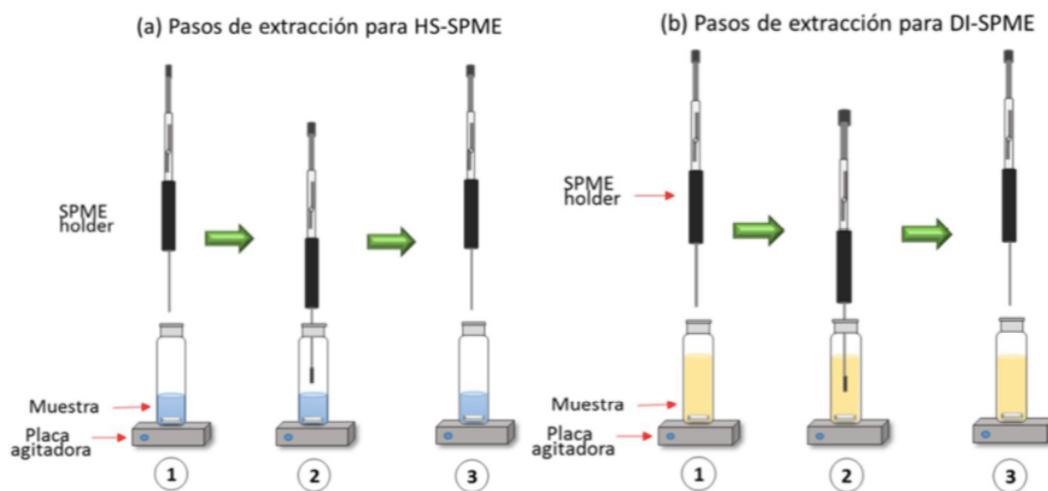


Figura 3. Esquema de los pasos de extracción para HS-SPME(a) y para DI-SPME (b)³²

Además, existen automuestreadores, que permiten llevar a cabo todo el proceso de extracción de una forma automatizada, como el que se ha utilizado en este trabajo.

5.2. ANÁLISIS MEDIANTE GC-HRMS CON ANALIZADOR ORBITRAP

La cromatografía de gases (*Gas Chromatography*, GC) es la técnica de separación escogida para identificar compuestos orgánicos con puntos de ebullición menores de 450°C, compuesto volátiles y gases, todo ello con una gran sensibilidad. Esta técnica se combina con la espectrometría de masas (*Mass Spectrometry*, MS) que nos da información, con mucha sensibilidad, de la estructura y peso molecular de compuestos analizados. Ambas técnicas combinadas nos dan una gran cantidad de información tanto cualitativa como cuantitativa. En la Figura 4 podemos ver un esquema de las partes que componen un cromatógrafo de gases.

La GC consiste en la inyección de una muestra volatilizada en una columna cromatográfica (fase estacionaria), por la que transcurre un gas inerte (fase móvil) que

transporta la muestra a través de la columna. La separación de los analitos se produce en función de sus presiones de vapor y de la afinidad con la fase estacionaria y la fase móvil³³.

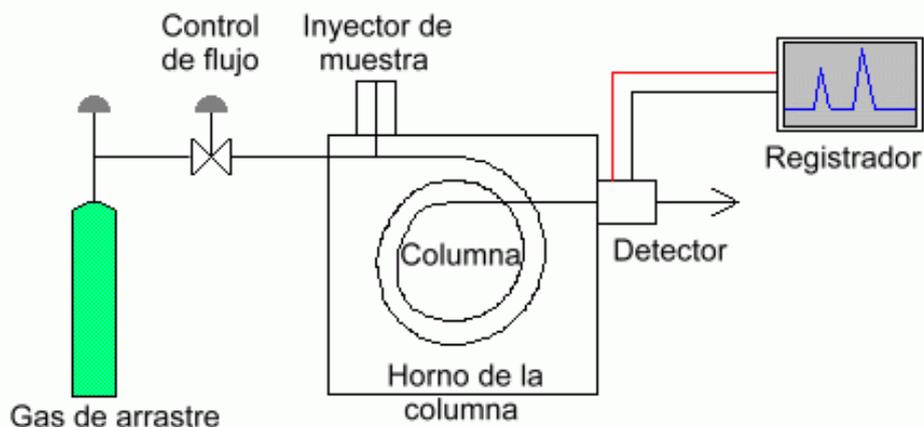


Figura 4. Esquema de las partes de un cromatógrafo de gases³⁴

Después de extraer los analitos mediante el método de extracción seleccionado, en el caso de este estudio fue SPME, se procede a la inyección de la muestra en la columna. Existen varios modos de inyección³⁵:

- Con división (*Split*)
- Sin división (*Splitless*)
- En columna (*On-column*)
- En grandes volúmenes (*Large Volume Injection*)

El sistema de inyección más utilizado en GC es el inyector *split/splitless*, que es el que se ha utilizado en este estudio. Cuando trabaja en modo *split*, la muestra se divide en dos partes, una que se transfiere a la columna y otra que se expulsa del inyector por una válvula. El modo *splitless* consiste en mantener cerrada la válvula de *split* durante unos pocos minutos, para después abrirla y purgar la muestra que se encuentra en el interior del inyector, introduciendo así la mayor parte de la muestra, con lo que conseguimos una sensibilidad mayor. Este último es el modo en el que se ha trabajado en este análisis. En la Figura 5 se muestra un inyector en modo *split* y otro en modo *splitless*.

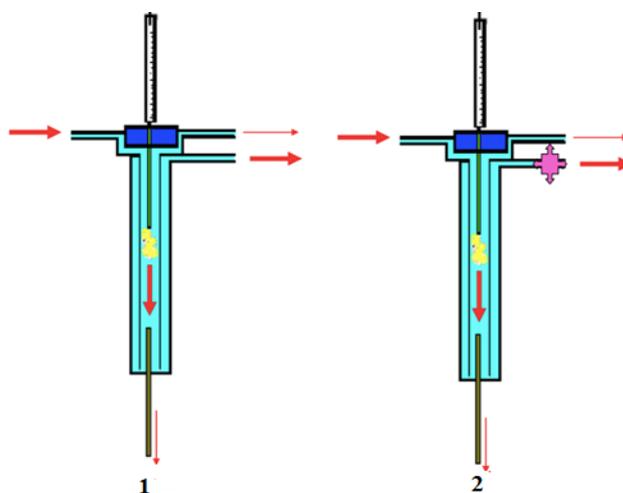


Figura 5. Inyector en modo Split (1) e inyector en modo splitless (2)³⁶

Cuando la muestra sale de la columna llega al detector que puede ser: FID, detector de conductividad térmica (*Thermal Conductivity Detector*, TCD), detector de ionización de llama, detector de captura electrónica (*Electron Capture Detector*, ECD), detector de fotoionización (*Photoionization Detector*, PID), detector de ionización de helio de descarga pulsada (*Pulsed Discharge Helium Ionization Detector*, PDHID), detector fotométrico de llama (*Flame Photometric Detector*, FPD), detector de conductividad electrolítica (*Electolytic Conductivity Detector*, ELCD) y espectrómetro de masas (*Mass Spectrometry*, MS). Este último es el más utilizado en cromatografía, ya que es una herramienta muy poderosa y la más apropiada para mezclas complejas orgánicas³⁵.

En este trabajo el detector elegido ha sido el MS, que se caracteriza por la generación de iones y separación de estos en función de su relación masa/carga (m/z). Dependiendo de la exactitud del dato de m/z que proporcione, el detector puede ser de baja resolución (aproxima al número entero más cercano) o de alta resolución (hasta cuarta o quinta cifra decimal). El MS utilizado ha sido de alta resolución HRMS, concretamente se ha hecho uso de un analizador Orbitrap.

El espectrómetro de masas se compone de 5 elementos básicos: un sistema de introducción de la muestra, un sistema de ionización de la muestra, un analizador de masas, un detector y, un sistema de recepción y tratamiento de datos, como se muestra en la Figura 6.

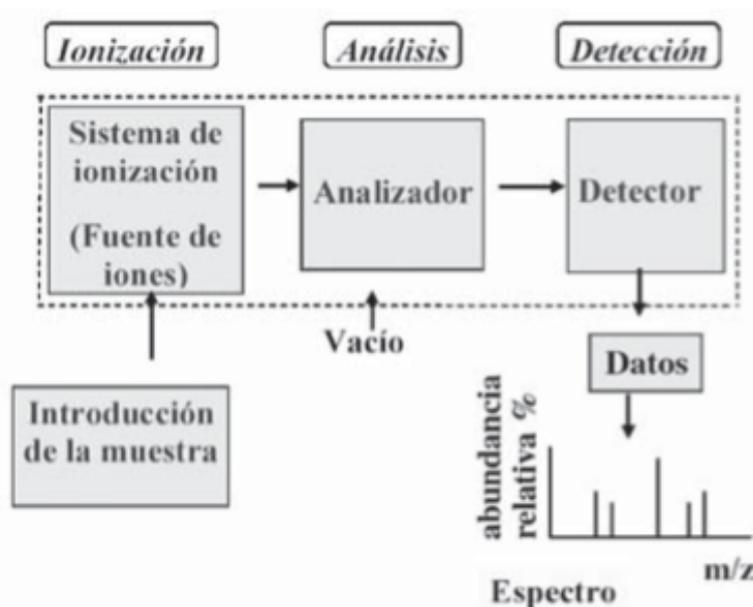


Figura 6. Esquema de un espectrómetro de masas³⁷

La ionización de la muestra se puede llevar a cabo mediante ionización química (*Chemical Ionization*, CI) o ionización electrónica (*Electron Ionization*, EI). La EI consiste en el bombardeo de electrones que “chocan” con las moléculas de la muestra provocando su ionización. La CI es similar pero en vez de bombardear con electrones, se bombardea con un gas reactivo. En este estudio se ha usado la ionización electrónica.

También hay varios tipos de analizadores de masas: Analizador de tiempo de vuelo (*Tine Of Flight*, TOF), analizador de trampa de iones (*Ion-Tramp*, IT), analizador de resonancia iónica en ciclotrón con transformada de Fourier (*Fourier Transform Ion*

Cyclotron Resonance, FT-ICR), analizador de cuadrupolo (*Quadrupole*, Q) y analizador Orbitrap. Este último es el utilizado en este trabajo y se basa en la separación de iones en un campo eléctrico oscilante. Este equipo es capaz de identificar contaminantes conocidos de una forma rápida y fiable, incluso cuando no existen estándares disponibles³⁸. En la figura 6 se muestra una imagen de cómo es el analizador Orbitrap.

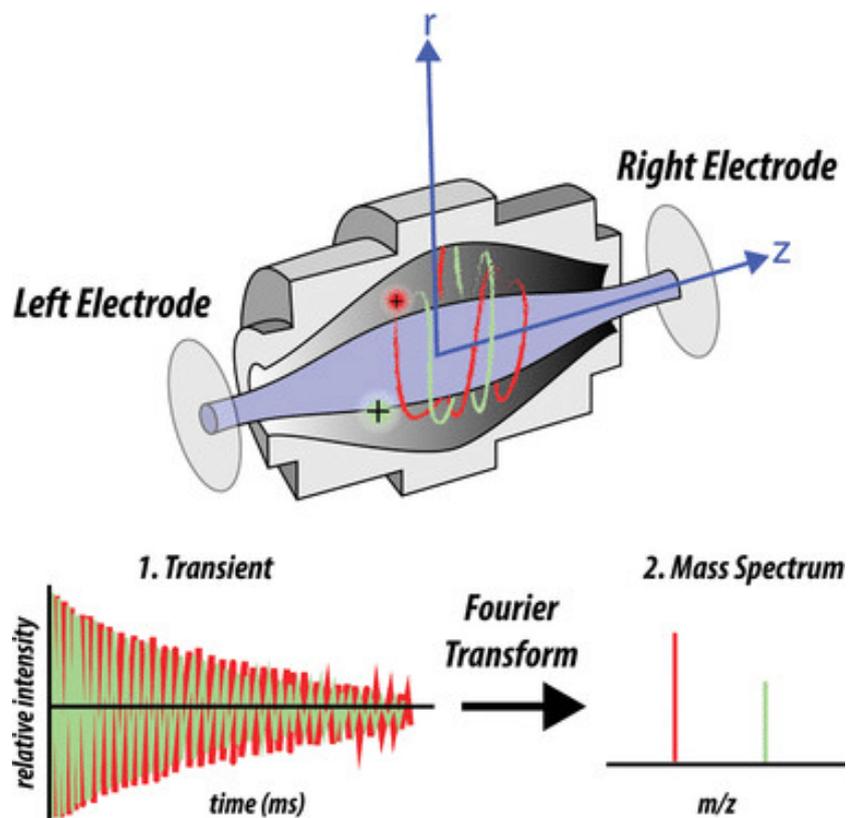


Figura 7. Analizador Orbitrap³⁹

El analizador de masas puede trabajar en dos modos:

- **Barrido completo (*Full scan*):** Dentro de un rango m/z seleccionado anteriormente, se analiza de forma continua todo el contenido de la columna. Este es el modo usado en este trabajo.
- **Monitorización de iones seleccionados (*Selected ion monitoring, SIM*):** Se seleccionan algunos iones de interés y esos son los que se analizan de una forma más prolongada, aumentando la relación señal/ruido y aumentando así la sensibilidad de los iones seleccionados.

5.3. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

La validación de un método analítico es fundamental para verificar que los resultados obtenidos son fiables. Se realizan una serie de procesos normalizados que nos dan datos sobre la adecuación del método a nuestro objetivo.

La validación de un método se encuentra regulada y reglada por unos modelos que son la guía SANTE⁴⁰, EURACHEM⁴¹ y UNE-ISO 9001⁴², y se evalúan los siguientes parámetros:

- **LOD:** Concentración mínima que es capaz de identificar en la que la relación señal/ruido es menor de 3.
- **LOQ:** Concentración mínima que puede ser detectada con unos valores aceptables de precisión y exactitud, y que la relación señal/ruido es menor de 10.
- **Linealidad:** Es el rango en el que la concentración del analito es proporcional a la señal que produce.
- **Veracidad:** Grado de concordancia entre el valor obtenido en el ensayo y el valor de referencia.
- **Precisión:** Grado de concordancia entre los resultados obtenidos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. MATERIALES

- Se utilizaron micropipetas suministradas por Thermo Finnopipette (Waltham, MA USA) de los volúmenes 1-10 mL, 1-100 µL y 100-1000 µL.
- También se usaron matraces aforados de 10 mL, 20 mL, 25 mL y 50 mL de Fisher Scientific (Madrid, España).
- Fueron utilizados viales de vidrio de 20 mL y tapones magnéticos con septum de PTFE/silicona, todo ello proporcionado por Supelco (Bellafonte, PA, USA).

6.2. EQUIPO

- La fibra usada era de poliacrilato (PA) de 85 µm de espesor (Supelco, Bellafonte, PA, USA).
- El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Trace 1300 GC, que cuenta con un automuestreador Triplus RSH. El GC está acoplado a un analizador de masas Q-exactive Orbitrap. Todo ello de Thermo Fisher Scientifics (Bremen, Alemania)
- La columna cromatográfica era de 30 m x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 µm de espesor. Factor VF-5MS de Agilent (Santa Clara, CA, USA).
- Los cromatogramas se procesaron con el software XcaliburTM versión 4.1., con Quanbrowser y Qualbrowser (Thermo Fisher Scientifics, Les Elis, Francia)
- Los datos se analizaron mediante el software Thermo ScientificsTM TraceFinderTM en la versión 4.1. (Thermo Fisher Scientifics, Les Elis, Francia).

6.3. REACTIVOS

- Se utilizó una disolución mezcla de PAHs (QTM-standard, 2000 $\mu\text{g/mL}$ de cada compuesto en disolvente diclorometano proporcionado por Sigma Aldrich (St. Louis, USA).
- El estándar interno (*Internal Standard*, IS) fue fluoranteno d-10 suministrado por Supelco (Madrid, España).
- Como disolvente se utilizó acetona de Sigma Aldrich (St. Louis, USA).
- Se utilizó para el lavado de las botellas n-hexano de Sigma Aldrich (St. Louis, USA) y agua Milli Q de Fisher Scientific (Madrid, España).
- El gas portador utilizado fue Helio de pureza 99.9999% proporcionado por Praxair (Málaga, España).

Se prepararon tres disoluciones estándar a partir de la disolución patrón mezcla de PAHs a tres concentraciones diferentes 100, 10 y 1 $\mu\text{g/L}$ con acetona como disolvente. La disolución IS fluoranteno d-10 contenía 500 $\mu\text{g/L}$ también se preparó en acetona. Todas las disoluciones preparadas fueron selladas con parafilm y almacenadas en un congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes de la utilización de cualquiera de ellas, se agitaban 10 segundos en un Vortex para asegurar la homogeneidad de la misma.

6.4. CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se analizaron veintiséis muestras de aguas residuales urbanas, que fueron proporcionadas por distintas plantas de tratamiento, situadas en el sur de España, en las provincias de Almería y Sevilla. Once de las muestras correspondían a influentes y las otras quince a efluentes, todas ellas sometidas a diversos tratamientos: tanque Imhoff, cultivo de microalgas, humedales artificiales, filtros de lecho bacteriano, laguna aireada, macrófitas flotantes, aireación prolongada, humedales electrogénicos y sistemas de reactor de membrana.

Las muestras se recogieron en botellas de vidrio ámbar, que previamente habían sido lavadas con hexano, acetona y agua Milli Q, y a continuación se introdujeron en una estufa a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 horas. Las muestras de agua se almacenaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se analizaron en las 24 h siguientes a su recolección. No fue necesario realizar ningún pretratamiento antes de realizar el análisis.

6.5. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

Para preparar la muestra se toman 10 mL de agua residual sin filtrar y se introduce en un vial de 20 mL. A continuación, se añaden 10 μL de IS y 240 μL de acetona. Una vez introducidos todos los volúmenes, se tapa rápidamente el vial y se lleva a agitación durante un minuto en un vortex.

Para asegurar una extracción rápida de los analitos, los viales se mantienen en agitación constante durante el proceso de adsorción en la fibra. La extracción SPME se lleva a cabo en el inyector automático Triplus RSH.

La fibra de PA se expone durante 40 minutos a 75 °C al espacio cabeza del vial, para que se lleve a cabo la extracción de los analitos. Seguidamente, se inyecta la muestra automáticamente en un inyector split/splitless, donde se produce la desorción de los analitos durante 3 minutos a 280 °C.

Para terminar, la fibra permanece durante 10 minutos más en el puerto de inyección. Además, se realizan blancos periódicamente para evaluar el potencial efecto memoria de la fibra.

6.6. ANALISIS CROMATOGRÁFICO

El caudal del gas portador Helio se mantuvo constante a un flujo de 1 mL/min.

- **Inyector.** El inyector trabajó durante todo el análisis a una temperatura de 280 °C. El caudal de split fue de 50 mL y el tiempo de splitless de 3 minutos.
- **Horno cromatográfico.** Inicialmente, la columna se mantuvo 2 minutos a 40 °C. A continuación, se elevó la temperatura hasta 170 °C a una velocidad de 20 °C min⁻¹. Una vez alcanzada esta temperatura, se continuó elevándola hasta 310 °C, esta vez a una velocidad de 10 °C min⁻¹. Adquirido este valor, se mantuvo la temperatura durante 2 minutos más. El tiempo total del análisis fue de 31 minutos.
- **Analizador de masas.** El analizador de masas se programó en modo EI con una energía cinética de 70 eV. El barrido se realizó en modo *full scan* con un rango de escaneo de 50 a 500 m/z. La resolución de la separación fue de 60000 (*Full Width at Half Maximun*, FWHM). Cuenta con una trampa de iones trabajando en modo de ganancia automática a 1E6. La línea de transferencia y la fuente de iones se mantuvo a una temperatura de 250 °C.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. OPTIMIZACIÓN DEL METODO GC-HRMS

Para la optimización del método, se inyectaron los estándares de PAHs en la solución mezcla, obteniéndose una separación cromatográfica adecuada para cada componente en las condiciones ya mencionadas anteriormente. Los tiempos de retención para cada compuesto se incluyen en la Tabla 12.

Un resumen de los datos espectrométricos más relevantes de los compuestos objeto de estudio se muestran en la Tabla 12. En ella se muestran los tiempos de retención, las masas exactas del ion molecular y las masas experimentales obtenidas para las distintas *m/z* monitorizadas.

En las Figuras de la 8 a la 22 se muestran los picos cromatográficos de cada uno de los 15 PAHs, indicando el tiempo de retención bajo las condiciones de análisis que previamente se han citado. Además, se muestra el espectro de masas de cada compuesto indicando en todos los casos el ion de cuantificación (*Quantification*, Q).

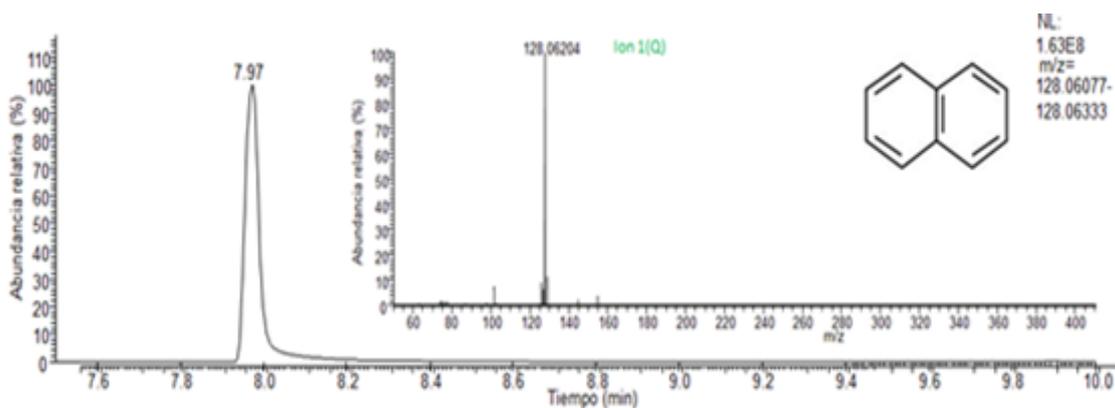


Figura 8. Pico cromatográfico correspondiente al naftaleno en una disolución de $5\mu\text{g/L}$ con su correspondiente espectro de masas.

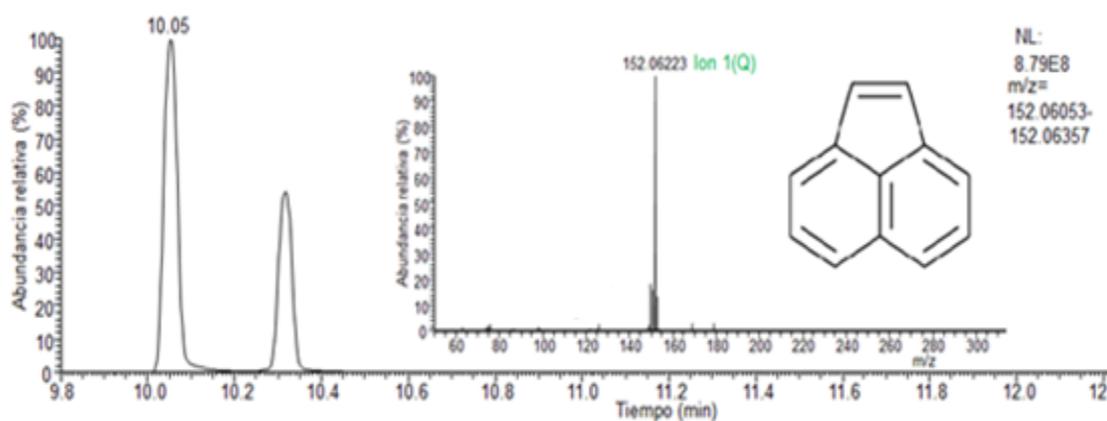


Figura 9. Pico cromatográfico correspondiente al acenafileno (izquierda) en una disolución de $5\mu\text{g/L}$ con su correspondiente espectro de masas. El pico de la derecha corresponde a acenafteno, que ha sido satisfactoriamente separado.

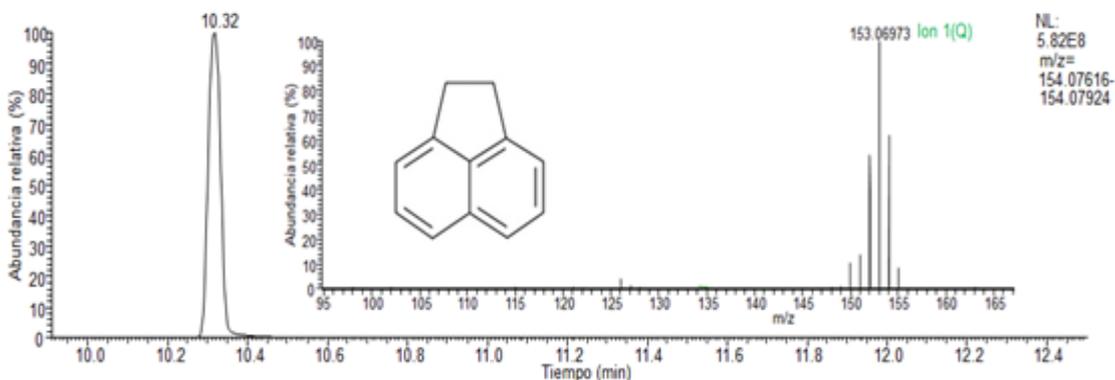


Figura 10. Pico cromatográfico correspondiente al acenafteno en una disolución de $5\mu\text{g/L}$ con su correspondiente espectro de masas.

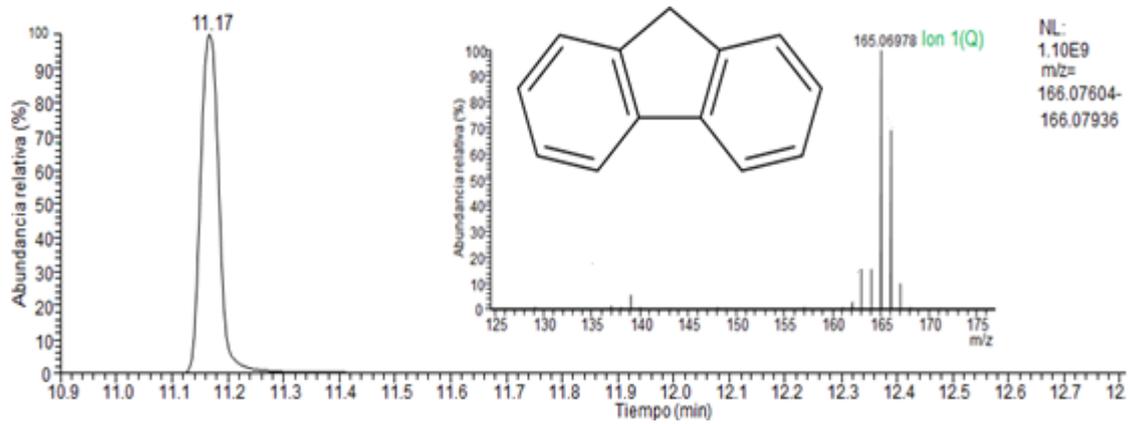


Figura 11. Pico cromatográfico correspondiente al fluoreno en una disolución de 5µg/L con su correspondiente espectro de masas.

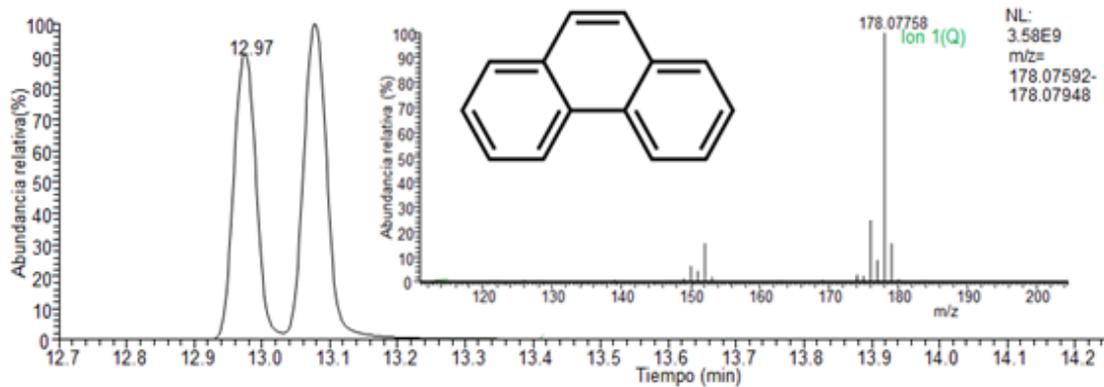


Figura 12. Pico cromatográfico correspondiente al fenantreno (izquierda) en una disolución de 5µg/L con su correspondiente espectro de masas. El pico de la derecha corresponde a antraceno, que posee el mismo ion característico y ha sido satisfactoriamente separado.

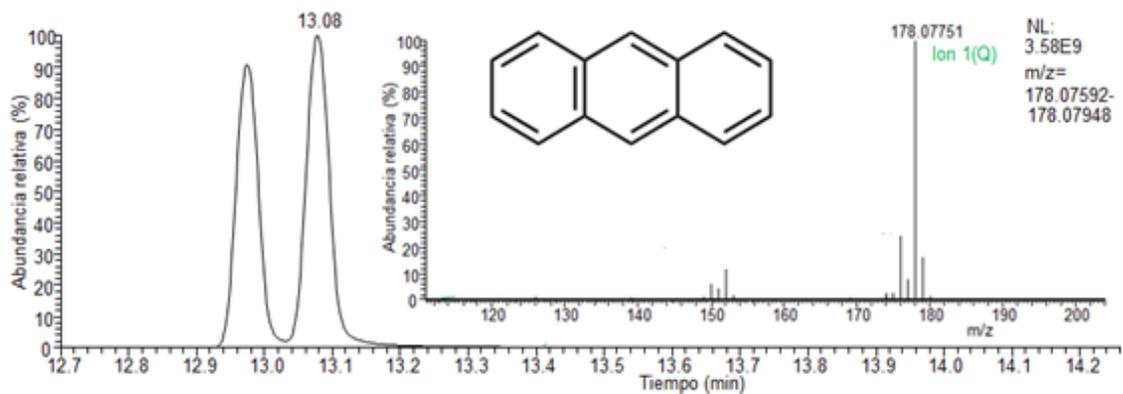


Figura 13. Pico cromatográfico correspondiente al antraceno (derecha) en una disolución de 5µg/L con su correspondiente espectro de masas. El pico de la izquierda corresponde a fenantreno, que posee el mismo ion característico y ha sido satisfactoriamente separado.

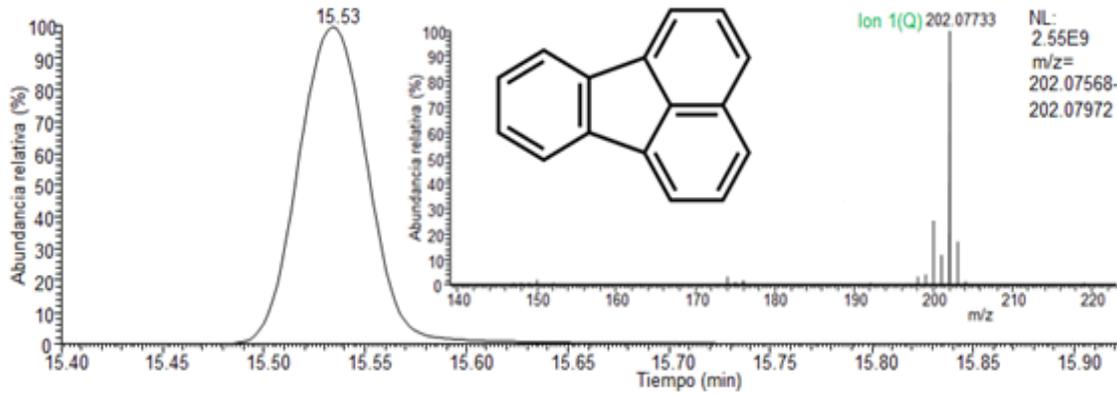


Figura 14. Pico cromatográfico correspondiente al fluoranteno en una disolución de 5 μ g/L con su correspondiente espectro de masas.

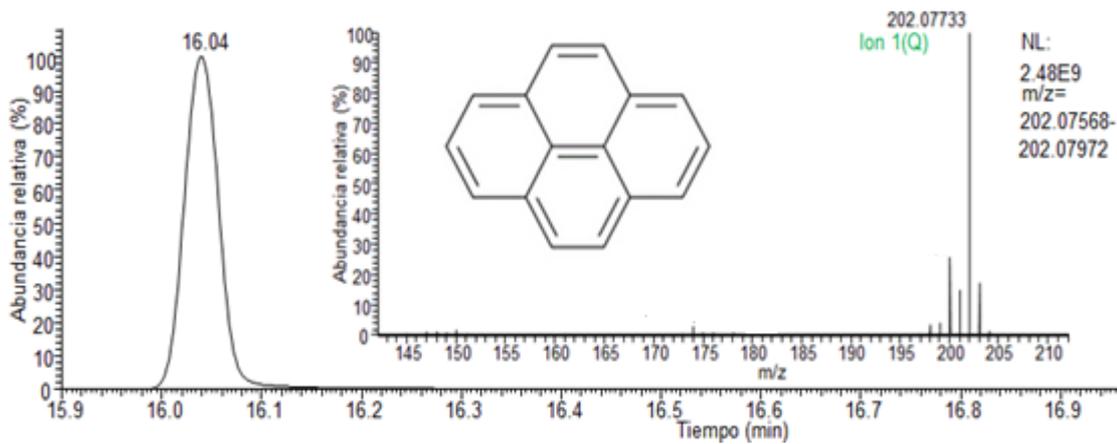


Figura 15. Pico cromatográfico correspondiente al pireno en una disolución de 5 μ g/L con su correspondiente espectro de masas.

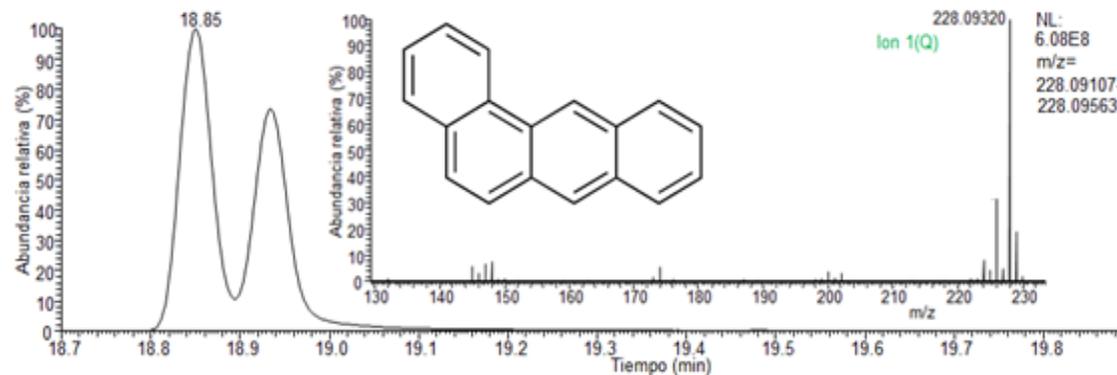


Figura 16. Pico cromatográfico correspondiente al benzo[a]antraceno (izquierda) en una disolución de 5 μ g/L con su correspondiente espectro de masas. El pico de la derecha corresponde a criseno, que posee el mismo ion característico y que ha sido satisfactoriamente separado.

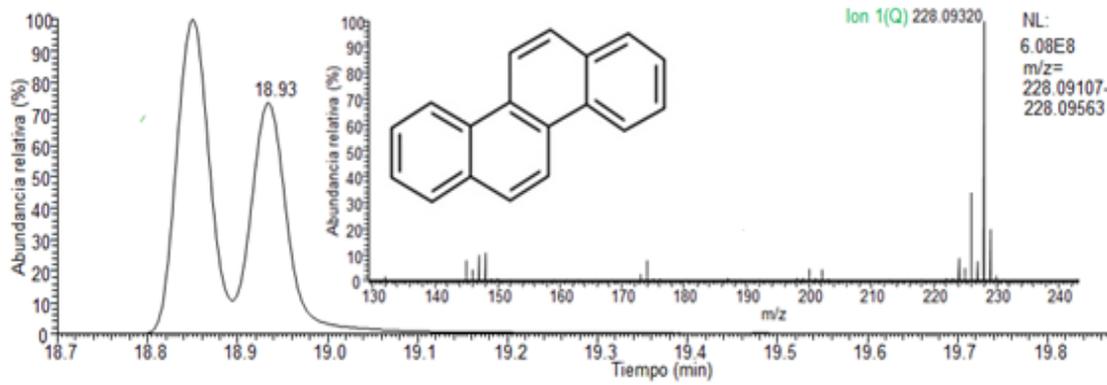


Figura 17. Pico cromatográfico correspondiente al Criseno (derecha) en una disolución de 5 μ g/L con su correspondiente espectro de masas. El pico de la izquierda corresponde a benzo[a]antraceno, que posee el mismo ion característico y que ha sido satisfactoriamente separado.

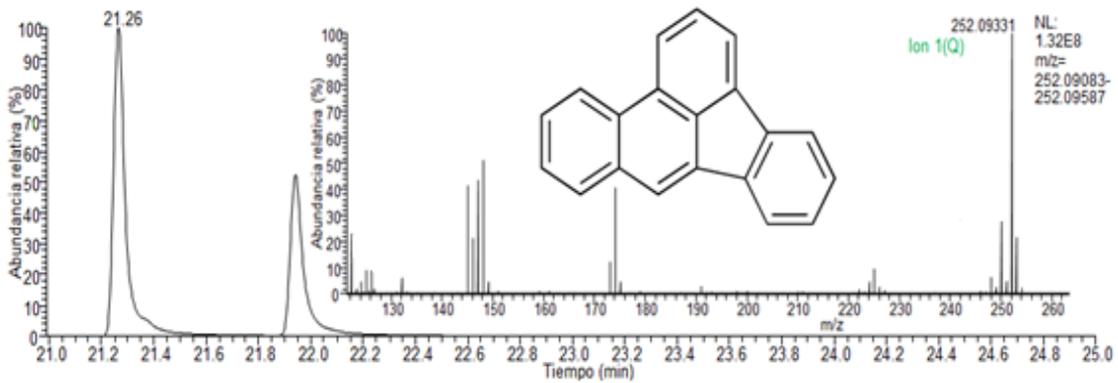


Figura 18. Pico cromatográfico correspondiente al benzo[b]fluoranteno en una disolución de 5 μ g/L con su correspondiente espectro de masas. El pico de la derecha corresponde a benzo[a]pireno, que posee el mismo ion característico y que ha sido satisfactoriamente separado.

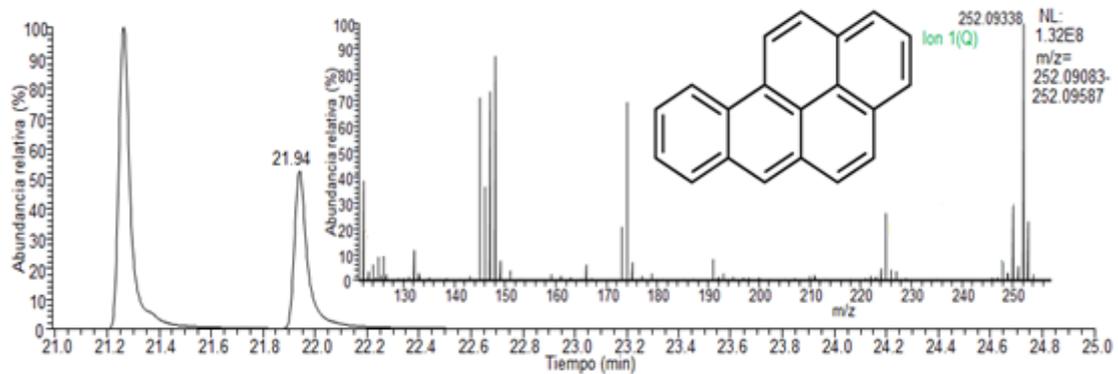


Figura 19. Pico cromatográfico correspondiente al benzo[a]pireno (derecha) en una disolución de 5 μ g/L con su correspondiente espectro de masas. El pico de la izquierda corresponde a benzo[b]fluoranteno, que posee el mismo ion característico y que ha sido satisfactoriamente separado.

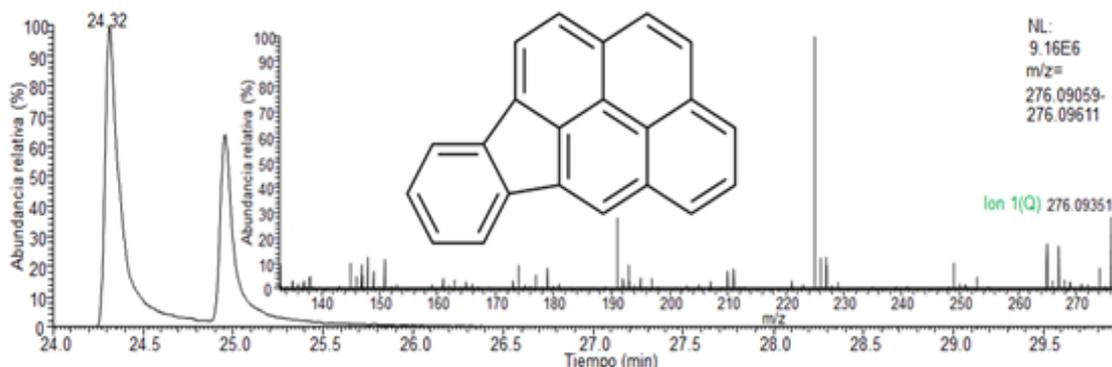


Figura 20. Pico cromatográfico correspondiente al indeno[123-cd]pireno (izquierda) en una disolución de 5 μ g/L con su correspondiente espectro de masas. El pico de la derecha corresponde a dibenzo[ah]antraceno, que posee el mismo ion característico y que ha sido satisfactoriamente separado

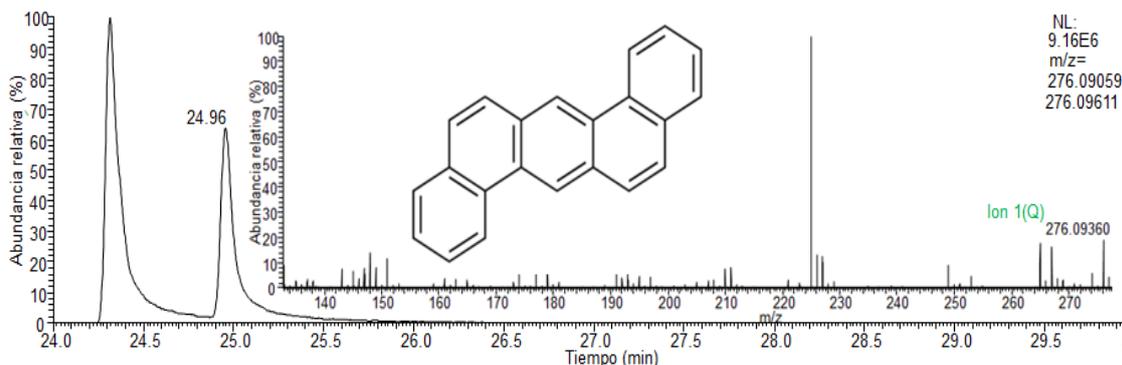


Figura 21. Pico cromatográfico correspondiente al dibenzo[ah]antraceno (derecha) en una disolución de 5 μ g/L con su correspondiente espectro de masas. El pico de la izquierda corresponde a indeno[123-cd]pireno, que posee el mismo ion característico y que ha sido satisfactoriamente separado

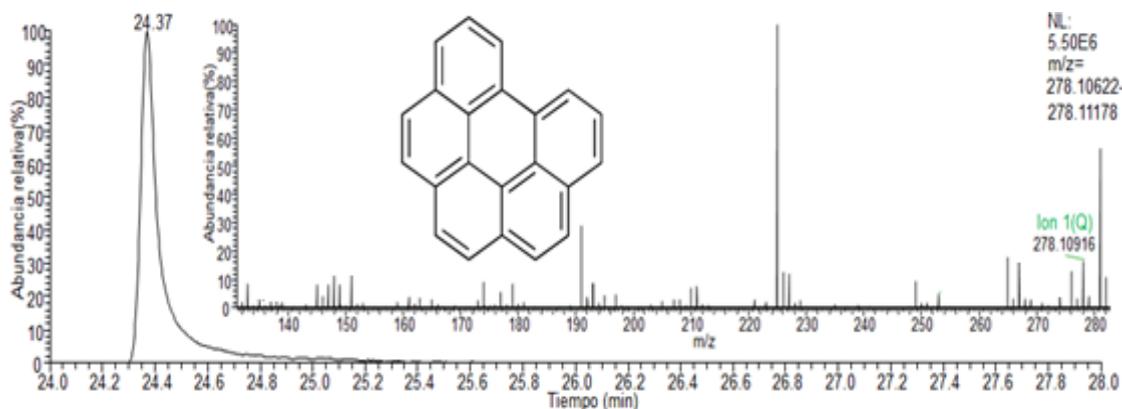


Figura 22. Pico cromatográfico correspondiente al benzo[ghi]perileno en una disolución de 5 μ g/L con su correspondiente espectro de masa.

Tabla 12. Parámetros espectrométricas obtenidos experimentalmente para los PAHs objeto de estudio

Compuesto	RT (min)	Fórmula molecular	Masa molecular ⁽¹⁾	Ion 1 (Q)	m/z 1 ⁽²⁾	Ion 2	m/z 2 ⁽²⁾	Ion 3	m/z 3 ⁽²⁾	Ion 4	m/z 4 ⁽²⁾
Naftaleno	7.97	C ₁₀ H ₈	128.06205	C ₁₀ H ₈	128.06204 (-0.092)	C ₁₀ H ₇	127.05429 (0.104)	C ₁₀ H ₆	126.04644 (0.303)	C ₈ H ₆	102.04646 (0.571)
Acenaftileno	10.05	C ₁₂ H ₈	152.06205	C ₁₂ H ₈	152.06223 (1.172)	C ₁₂ H ₇	151.05423 (0.021)	C ₁₂ H ₆	150.04658 (1.188)	C ₁₀ H ₆	126.04668 (2.207)
Acenafteno	10.32	C ₁₂ H ₁₀	154.07770	C ₁₂ H ₉	153.06973 (-0.959)	C ₁₂ H ₁₀	154.07736 (-2.219)	C ₁₂ H ₈	152.06203 (-0.144)	C ₆ H ₄	76.03080 (0.635)
Fluoreno	11.17	C ₁₃ H ₁₀	166.07770	C ₁₃ H ₉	165.06978 (-0.587)	C ₁₃ H ₁₀	166.07736 (-2.059)	C ₁₃ H ₇	163.05428 (0.326)	C ₁₁ H ₇	139.05421 (-0.121)
Fenantreno	12.97	C ₁₄ H ₁₀	178.07770	C ₁₄ H ₁₀	178.07758 (-0.685)	C ₁₄ H ₈	176.06206 (0.042)	C ₁₂ H ₈	152.06201 (-0.275)	C ₁₂ H ₇	151.05423 (0.021)
Antraceno	13.08	C ₁₄ H ₁₀	178.07770	C ₁₄ H ₁₀	178.07751 (-1.078)	C ₁₄ H ₈	176.06201 (-0.238)	C ₁₂ H ₈	152.06195 (-0.472)	C ₁₂ H ₇	151.05423 (0.021)
Fluoranteno d10	15.50	C ₁₆ D ₁₀	212..15592	C ₁₆ D ₁₀	212.14015 (-1.506)	C ₁₆ D ₈	208.11189 (-1.806)	C ₁₄ D ₆	180.09335 (-0.011)	C ₈ D ₅	106.06979 (-1.607)
Fluoranteno	15.53	C ₁₆ H ₁₀	202.07770	C ₁₆ H ₁₀	202.07733 (-1.840)	C ₁₆ H ₈	200.06189 (-0.809)	C ₁₄ H ₆	174.04623 (-0.987)	C ₈ H ₅	101.03849 (-0.859)
Pireno	16.04	C ₁₆ H ₁₀	202.07770	C ₁₆ H ₁₀	202.07733 (-1.840)	C ₁₆ H ₈	200.06187 (-0.909)	C ₁₄ H ₆	174.04619 (-1.217)	C ₈ H ₅	101.03879 (2.111)
Benzo[a]antraceno	18.85	C ₁₈ H ₁₂	228.09335	C ₁₈ H ₁₂	228.09320 (-0.666)	C ₁₈ H ₁₀	226.07773 (0.124)	C ₁₆ H ₈	200.06201 (-0.209)	C ₉ H ₆	114.04640 (-0.016)

Criseno	18.93	C ₁₈ H ₁₂	228.09335	C ₁₈ H ₁₂	228.09320 (-0.666)	C ₁₈ H ₁₀	226.07773 (0.124)	C ₁₆ H ₈	200.06201 (-0.209)	C ₉ H ₆	114.04640 (-0.016)
Benzo[b] fluoranteno	21.26	C ₂₀ H ₁₂	252.09335	C ₂₀ H ₁₂	252.09331 (-0.166)	C ₂₀ H ₁₀	250.07780 (0.392)	C ₂₀ H ₈	248.06229 (0.960)	C ₁₀ H ₆	126.04646 (0.462)
Benzo[a]pireno	21.94	C ₂₀ H ₁₂	252.09335	C ₂₀ H ₁₂	252.09338 (0.111)	C ₂₀ H ₁₀	250.07790 (0.792)	C ₂₀ H ₈	248.06221 (0.638)	C ₁₀ H ₆	126.04646 (0.462)
Indeno[123cd] pireno	24.32	C ₂₂ H ₁₂	276.09335	C ₂₂ H ₁₂	276.09351 (0.572)	C ₂₂ H ₁₀	274.07812 (1.525)	C ₂₂ H ₈	272.06205 (-0.007)	C ₁₁ H ₆	138.04649 (0.639)
Dibenzo[ah] antraceno	24.35	C ₂₂ H ₁₄	278.10900	C ₂₂ H ₁₄	278.10916 (0.568)	C ₂₂ H ₁₂	276.09362 (0.971)	C ₂₂ H ₁₀	274.07797 (0.978)	C ₁₁ H ₆	138.04646 (0.422)
Benzo[ghi] perileno	24.96	C ₂₂ H ₁₂	276.09335	C ₂₂ H ₁₂	276.09360 (0.898)	C ₂₂ H ₁₀	274.07809 (1.416)	C ₂₂ H ₈	272.06205 (-0.007)	C ₁₁ H ₆	138.04640 (-0.013)

(1) Masa molecular exacta del ion molecular correspondiente a cada compuesto

(2) Entre paréntesis aparece el error asociado a la medida en ppm

7.2. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

El método de extracción HS-SPME empleado en el presente trabajo había sido previamente optimizado por el grupo de investigación “Química analítica de contaminantes”^{43,44} pero para ser empleado con un instrumento GC-HRMS completamente diferente, utilizando un espectrómetro de masas de alta resolución que empleaba un analizador de sector magnético de doble enfoque que trabajaba midiendo iones característicos de los compuestos, en modo SIM.

En este trabajo se ha llevado a cabo, una adaptación de dicha metodología utilizando un nuevo instrumental como es el sistema GC-Orbitrap que permite trabajar a niveles iguales o superiores de resolución de masas y trabajar adquiriendo espectros completos lo que sería de gran utilidad para comparar espectros experimentalmente obtenidos con bibliotecas espectrales como la NIST o para la búsqueda de desconocidos o búsqueda retrospectiva de contaminantes y/o metabolitos.

En los artículos publicados por *Domínguez et al.*^{43,44} se optimizan diferentes parámetros del proceso de extracción. Inicialmente evaluaron el tiempo necesario para el acondicionamiento de la fibra, ya que no se observó una buena reproducibilidad de los resultados empleando el tiempo propuesto por la casa comercial (30 min a 280 °C). Concluyeron que la fibra de PA requería un acondicionamiento previo de 1 hora a 280 °C, para mostrar así una buena sensibilidad y robustez del análisis. A continuación, evaluaron temperaturas y tiempos de extracción. Inicialmente, estudiaron la temperatura, primero a temperaturas bajas (40 y 50 °C) y después a temperaturas altas (60 y 75 °C). Obtuvieron que la extracción era más eficiente a altas temperaturas. Por tanto, establecieron como temperatura de extracción 75 °C. Una vez seleccionada la temperatura, optimizaron el tiempo de extracción, llevando a cabo extracciones a 75 °C durante 20, 30, 40 y 50 min. Finalmente se estableció como óptima la extracción a 75 °C durante 40 min. Además, también hacen referencia a la adición de modificadores orgánicos como acetona o metanol, para evitar la pérdida de analito por adsorción. Concluyeron que la adición de un 2.5 % de acetona producía unos resultados más eficientes en las extracciones.

Al inicio, a la hora de evaluar la aplicabilidad del método de extracción, se llevó a cabo el análisis de muestras fortificadas a distintas concentraciones. Inicialmente se planteó la preparación de las disoluciones patrón de concentración conocida sin adicionar acetona como modificador, pero los resultados no fueron satisfactorios y las rectas de calibrado no eran totalmente satisfactorias para algunos de los compuestos estudiados, como se puede comprobar en la recta de calibrado de la Figura 23 del compuesto dibenzo[ah]antraceno. Para alguno de los compuestos, los valores de RSD % obtenidos para las concentraciones más elevadas, tal y como puede observarse en la Figura 23, no fueron adecuados (> 20%) Por lo tanto, y atendiendo a resultados previos se llevó a cabo la adición de acetona (2.5 %) lo que permitió obtener resultados aceptables como puede verse en la Tabla 14.

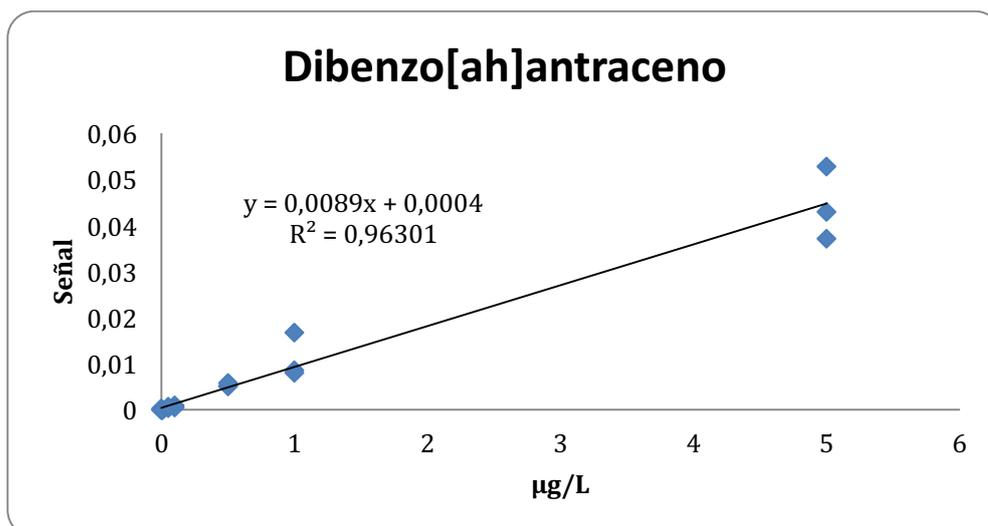


Figura 23. Recta de calibrado del compuesto dibenzo[ah]antraceno cuando se llevó a cabo la preparación de muestras fortificadas de concentraciones conocidas sin la adición de acetona

7.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Una vez optimizados los parámetros relativos a la caracterización de los compuestos y al proceso de extracción, debe validarse el método analítico con el fin de comprobar su aplicabilidad a los objetivos deseados. Los parámetros analíticos objeto de estudio fueron: linealidad, rango de trabajo, límite de cuantificación, veracidad y precisión.

Primero se procedió al estudio de la linealidad de cada uno de los compuestos. Para ello se prepararon muestras fortificadas de concentraciones entre 0,001 y 5 µg/L, y se sometieron al proceso de extracción SPME y posteriormente determinación mediante GC-HRMS. Se escogieron inicialmente doce niveles de concentración (0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 µg/L) En vista de los resultados tras ajustar los datos a ecuaciones lineales mediante el método de mínimos cuadrados, se establecieron dos rangos lineales entre las concentraciones elegidas para cada uno de los compuestos, como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Rangos lineales de las rectas de calibrado para cada compuesto con su respectivo coeficiente de determinación (R^2)

Compuesto	1		2	
	Rango lineal (ng/L)	R^2	Rango lineal (ng/L)	R^2
Naftaleno	1-50	0.9999	50-5000	0.9997
Acenaftileno	1-50	0.9999	50-5000	0.9984
Acenafteno	1-100	0.9999	100-5000	0.9997
Fluoreno	1-50	0.9991	50-5000	0.9994
Fenantreno	1-50	0.9996	50-5000	0.9994
Antraceno	1-50	0.9994	50-5000	0.9965
Fluoranteno	1-50	0.9998	50-5000	0.9994
Pireno	1-50	0.9999	50-5000	0.9996
Benzo[a]antraceno	5-50	0.9996	50-5000	0.9959
Criseno	5-100	0.9999	100-5000	0.9988
Benzo[b]fluoranteno	5-100	0.9999	100-5000	0.9992
Benzo[a]pireno	5-300	0.9997	300-5000	0.9997
Indeno[123-cd]pireno	1-100	0.9998	100-5000	0.9984
Dibenzo[ah]antraceno	5-100	0.9998	100-5000	0.9994
Benzo[ghi]perileno	5-100	0.9994	100-5000	0.9995

Todos los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos son superiores al 0.99 por lo que todas las rectas de calibrado establecidas se pueden considerar como aceptables. El hecho de seleccionar dos rangos lineales se debe fundamentalmente al amplio rango de trabajo ensayado. Una alternativa sería una calibración mediante una función polinómica. Aunque se validaron ambos rangos lineales de trabajo, en la presente memoria se incluyen los resultados de validación obtenidos para el primero de ellos, es decir, el correspondiente a las concentraciones más bajas, considerando los resultados obtenidos posteriormente en el análisis de muestras reales. En las Figuras 7 y 8 se muestran los dos rangos lineales de trabajo de uno de los PAHs estudiados, indeno[123-cd]pireno junto con la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación.

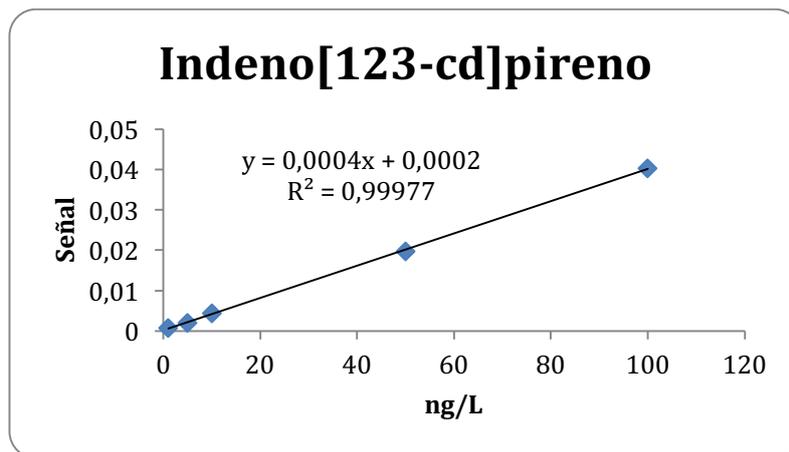


Figura 24. Recta de calibrado del primer rango lineal de trabajo del indeno[123-cd]pireno

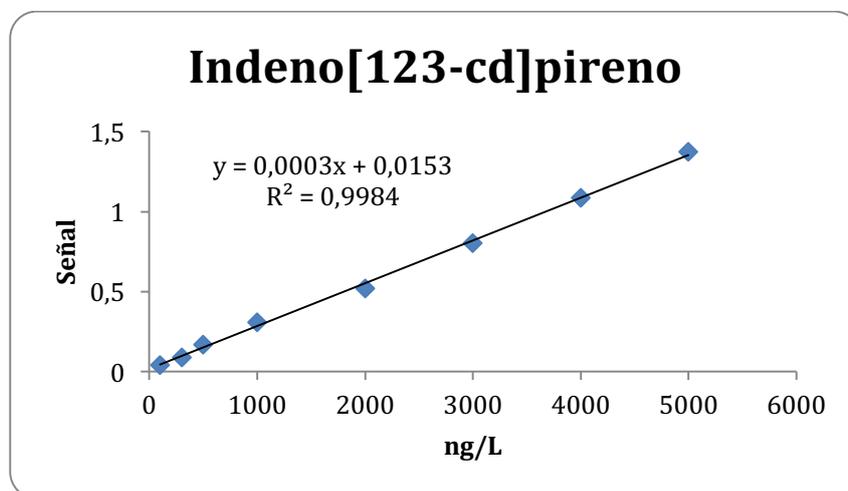


Figura 25. Recta de calibrado del segundo rango lineal de trabajo del indeno[123-cd]pireno

El LOQ se definió con anterioridad como la concentración más pequeña de analito que puede ser cuantificada cumpliendo con los criterios de precisión y veracidad establecidos. Según esta definición, se pueden tomar los valores de 1 y 5 ng/L como LOQ. Pero según otras definiciones, el LOQ se puede considerar como la concentración que proporciona una señal que es igual a 10 veces la desviación estándar del nivel de calibración más bajo, es decir que generaría unos valores entre 0.03-0.7 ng/L, como se muestra en la Tabla 14.

En la Tabla 14 se muestra los demás parámetros de validación estudiados.

Para comprobar la veracidad del método se estudian las recuperaciones a dos niveles de concentración, que corresponden al nivel más bajo (VL1) y al nivel más alto (VL2) dentro del rango lineal de trabajo escogido. Para cada nivel de concentración se realizaron 5 réplicas, cuya RSD (nos indica la precisión intradía del método) aparece entre paréntesis junto con el porcentaje de recuperación.

Además, se realizan estudios de la precisión interdía. Para ello se realizan tres réplicas a los niveles de concentración más bajo y más alto del rango de trabajo (los

mismos niveles que se utilizaron en el estudio de la veracidad), y se expresa como resultado la RSD, en tanto por ciento.

Según los criterios establecidos por la Guía SANTE, para una recuperación aceptable los valores deben encontrarse entre el 70 y el 120 %. Como se puede observar en la Tabla 14, los resultados obtenidos se encuentran entre un 89 y un 115 % para el nivel más bajo, y entre 93 y 111% para el nivel más alto de concentración estudiado. Por lo tanto, la veracidad del método puede ser considerada como aceptable.

La Guía SANTE también establece un nivel aceptable para la precisión, en el que la RSD debe ser menor o igual al 20%. Se puede concluir que la precisión interdía es adecuada, pues se alcanzaron valores entre 4 y 16% para todos los PAHs objeto de estudio. Además, se observan resultados satisfactorios para el estudio de la precisión intradía, ya que todos los valores oscilan entre 2 y 12 %. Todos estos datos se pueden observar en la Tabla 14, que muestra todos los parámetros de validación estudiado.

Los buenos resultados tanto en la precisión intradía como en la interdía, nos indica que el método seleccionado tiene una buena repetibilidad y reproducibilidad.

Tabla 14. Parámetros de validación del método analítico

Compuesto	Rango lineal (ng/L)	R ² (%)	LOQ (ng/L)	Recuperaciones (%)		Precisión interdía (RSD%)	
				VL1	VL2	VL1	VL2
Naftaleno	1-50	99.99	0.04	94(6)	100(3)	9	6
Acenaftileno	1-50	99.99	0.03	102(10)	109(8)	15	12
Acenafteno	1-100	99.99	0.05	98(7)	100(4)	9	7
Fluoreno	1-50	99.91	0.05	107(8)	104(6)	9	9
Fenantreno	1-50	99.96	0.09	91(2)	111(1)	6	4
Antraceno	1-50	99.94	0.08	99(9)	95(6)	11	10
Fluoranteno	1-50	99.98	0.02	101(8)	102(7)	11	9
Pireno	1-50	99.99	0.03	110(12)	100(6)	16	12
Benzo[a]antraceno	5-50	99.96	0.5	94(10)	107(8)	12	11
Criseno	5-100	99.99	0.5	106(8)	101(7)	9	10
Benzo[b]fluoranteno	5-100	99.99	0.6	100(10)	93(8)	13	11
Benzo[a]pireno	5-300	99.97	0.1	89(9)	104(7)	14	10
Indeno[123-cd]pireno	1-100	99.95	0.03	115(9)	102(8)	13	11
Dibenzo[ah]antraceno	5-100	99.98	0.7	114(11)	101(8)	14	10
Benzo[ghi]perileno	5-100	99.94	0.3	93(12)	101(8)	16	12

7.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES

En la tabla 15, se muestran las concentraciones de PAHs obtenidas en el análisis de las 26 muestras reales analizadas. Se puede observar que se encontró naftaleno en 16 de ellas, fenantreno en 7 y acenafteno en 1. La mayoría de las muestras en las que se ha encontrado fenantreno no han sido tratadas (6) y la otra se ha sometido a un tratamiento primario que solo elimina sólidos. La muestra que contiene acenafteno no ha sido tratada. Sin embargo, de las muestras en las que se ha encontrado naftaleno hay tanto no tratadas como algunas sometidas a tratamientos como Tanque Imhoff, cultivo de microalgas, humedales artificiales, laguna aireada y bioreactores de membrana.

Según los resultados obtenidos, todo parece indicar que la presencia de PAHs de elevada masa molecular (por ejemplo, fenantreno y acenafteno) suele estar asociada a aquellas muestras que no han sufrido tratamiento de reciclado o éste ha sido muy básico. Si no se eliminan las partículas sólidas en suspensión, es probable encontrar PAHs de elevada masa molecular y menor solubilidad en agua. Sin embargo, cuando se tratan por diferentes medios las aguas residuales y se minimizan las partículas en suspensión presentes en las mismas, los únicos PAHs que pueden llegar a encontrarse son los de menor masa molecular y mayor solubilidad en agua, como es el caso del naftaleno.

En la Figura 26 se muestra el pico encontrado en una de las muestras analizadas, que corresponde a naftaleno, con su espectro de masas respectivo.

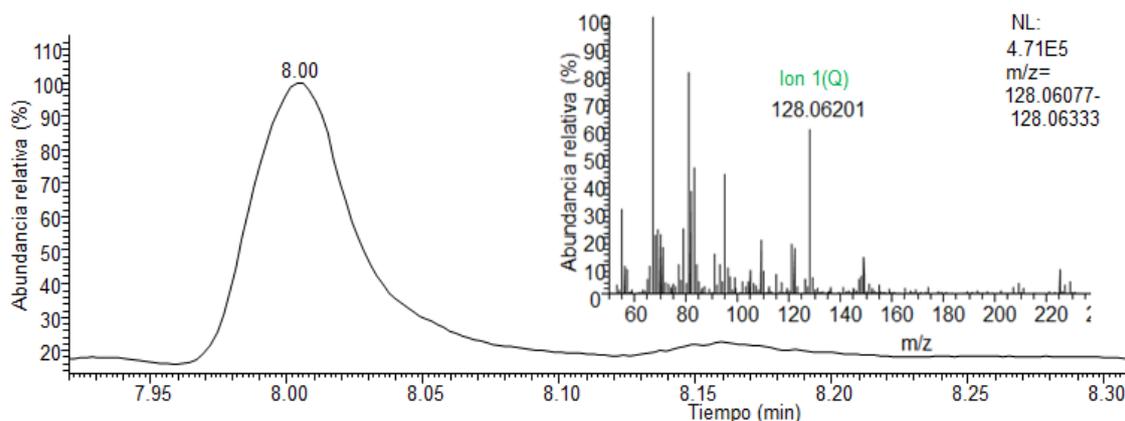


Figura 26. Pico correspondiente al naftaleno, tras la monitorización de su ión característico (128.06205) encontrado en el análisis de la muestra S5, junto con su espectro de masas

Tabla 15. Concentraciones de naftaleno, acenafteno y fenantreno encontradas en el análisis de muestras reales, indicando también el tratamiento de reciclado al que se ha sometido cada muestra

Muestra	Naftaleno (ng/L)	Acenafteno (ng/L)	Fenantreno (ng/L)	Tratamiento
S1	15.37		7.89	No tratado
S2	7.02		8.67	No tratado
S3	15.37		3.90	No tratado
S4	5.61			No tratado
S5	10.57			No tratado
S6	16.15			No tratado
S7	4.66			No tratado
S8	<LOQ			No tratado
S9	18.54	4.27	3.08	No tratado
S10	24.32		4.44	No tratado
S11	15.61		2.89	No tratado
S12	3.59		1.51	Tanque Imhoff
S13	2.39			Cultivo intenso de microalgas
S14	1.62			Humedales artificiales
S15	<LOQ			Humedales artificiales
S16				Humedales artificiales
S17	<LOQ			Filtros de lecho fijo
S18	<LOQ			Macrófitas flotantes
S19	<LOQ			Aireación extendida
S20	<LOQ			Humedales bioelectrogénicos
S21				Laguna aireada
S22	3.20			Laguna aireada
S23	<LOQ			Laguna aireada
S24	<LOQ			Laguna aireada
S25	1.47			Biorreactor de membrana
S26	1.33			Biorreactor de membrana

En el estudio realizado por Domínguez et al. 2018, en muestras analizadas de aguas residuales sin tratar y sin filtrar, se analizaron 18 muestras de las cuales todas contenían antraceno, 11 contenían fluoranteno y 6 contenían naftaleno. Además, también hay otros estudios que han demostrado la presencia de PAHs en aguas residuales como el de Robles et al.⁴⁵, el de Díaz et al.⁴⁶ o el de Hernández et al.⁴⁷. Los resultados observados en el citado estudio, junto con los obtenidos en el presente trabajo, parecen indicar que los sistemas de gestión de aguas residuales, bien cuando estos son nulos o muy escasos, bien cuando son más sofisticados, parecen ser pobres en la eliminación de algunos PAHs presentes como contaminantes en las aguas residuales.

8. CONCLUSIONES

- Se ha aplicado satisfactoriamente un método de extracción automatizado y en línea con GC-HRMS para la extracción de PAHs en aguas residuales de diversos tipos. El método de extracción, tiene la ventaja de ser altamente selectivo (en conjunción con GC-HRMS).
- Se ha desarrollado un nuevo método de determinación instrumental para el análisis de los PAHs en aguas residuales. empleando un espectrómetro de masas de alta resolución tipo Orbitrap permitiendo el análisis en modo barrido completo, haciendo posible la comparación de espectros con bibliotecas espectrales comerciales tipo NIST, análisis de desconocidos y análisis retrospectivo. Estas últimas formas de trabajar podrían ser objeto de estudio en futuros estudios.
- Se ha llevado a cabo la validación del método, lo que ha permitido establecer dos rangos de trabajo en los que se obtienen una adecuada linealidad ($R^2 > 0.99$), veracidad y precisión de los resultados. Los valores de LOQ obtenidos (1 y 5 ng/L) reflejaron la elevada sensibilidad del método.
- Se han analizado 26 muestras reales de aguas residuales tratadas de diferentes modos. En un sustancial número de ellas (todas menos dos) se ha encontrado al menos uno de los PAHs estudiados. A pesar del limitado número de muestras reales analizadas, se puede concluir que es habitual la presencia de PAHs más ligeros como el naftaleno en la mayoría de las muestras y es posible encontrar concentraciones variables de otros PAHs más pesados como acenafteno y fenantreno en muestras cuyos tratamientos han sido leves o no han sido tratadas, tal vez asociadas a las partículas sólidas en suspensión. En cualquier caso, este estudio, junto con otros previos, parecen indicar que los tratamientos de aguas residuales actuales no son completamente eficaces en la eliminación de estos contaminantes prioritarios.

9. BIBLIOGRAFÍA

- (1) <https://fandelagua.com/importancia-del-reciclaje-en-agua/> (último acceso septiembre de 2019)
- (2) <http://www.interempresas.net/Quimica/Articulos/100020-A-que-usos-se-destina-la-reutilizacion-de-aguas-residuales.html> (último acceso septiembre de 2019)
- (3) http://noticias.juridicas.com/base_datos/Admin/dir1991-271-ce.html (último acceso septiembre de 2019)
- (4) Real Decreto 1620/2007, publicado el 7 de diciembre de 2007, BOE, núm. 294, pág. 50639-50661
- (5) <https://iquimicas.com/proceso-de-tratamiento-de-aguas-residuales/> (último acceso septiembre de 2019)
- (6) <https://tratamientodeaguasresiduales.net/etapas-del-tratamiento-de-aguas-residuales/> (último acceso septiembre de 2019)
- (7) <https://www.aguasresiduales.info/revista/blog/tanque-imhoff-historia-y-principio-de-funcionamiento> (último acceso septiembre de 2019)
- (8) Martelo, J.; Lara, J.A.; Macrófitas flotantes en el tratamiento de aguas residuales; una revisión del estado del arte; *Ingeniería y ciencia, ing. cienc.*; volumen 8; enero 2012; 221-243
- (9) Bolado, S.; Martín, J.; Lebrero, R.; Pérez, S.; García, L.; Marín, D.; Lorenzo, A.; García, P.A.; Muñoz, R.; Tratamiento y valorización de aguas residuales mediante microalgas.
<https://www.iagua.es/blogs/juan-jose-salas/introduccion-humedales-artificiales-como-tratamiento-aguas-residuales> (último acceso septiembre de 2019)
- (10) <https://www.iagua.es/blogs/juan-jose-salas/lechos-bacterianos-tecnologia-robusta-pero-tanto-olvidada> (último acceso septiembre de 2019)
- (11) Jácome, A.; Suarez, J; Ures, Pablo; Fichas técnicas de proceso de plantas de tratamiento de aguas residuales de la industria textil; Septiembre 2015.
- (12) <http://www.smasa.net/aireacion-prolongada-aguas-residuales/> (último acceso septiembre de 2019)
- (13) <https://www.aguasresiduales.info/revista/noticias/bacterias-electroactivas-y-humedales-bioelectrogenicos-para-depurar-aguas-residuales--LCJwq> (último acceso septiembre de 2019)
- (14) http://www.yacutec.com/tecnologias-depuracion/tecnologias-depuracion_biorreactor-de-membrana.asp (último acceso septiembre de 2019)
- (15) <https://www.iagua.es/blogs/juan-jose-salas/introduccion-humedales-artificiales-como-tratamiento-aguas-residuales> (último acceso septiembre de 2019)
- (16) Kabzinski, A.K.M.; Cyran, J.; Juszczak, R; Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water (including drinking water) of Lodz;. *Polish Journal of Environmental Studies.*; 2002;11;695-706.
- (17) Marín Galvín, R.; Físicoquímica y microbiología de los medios acuáticos. Tratamiento y control de calidad de aguas; Editorial Díaz de Santos (2003)
- (18) Nuhu, A.A.; Basheer, C.; Shaikh, A.A.; Al-Arfaj, A.R.; Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Using Nanoporous Material Prepared from Waste Avian Egg Shell;. *Journal of Nanomaterials*; 2012.
- (19) Jiries, A.; Hussain, H.; Lintelmann, J.; Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater, sediments, sludge and plants in Karak Province, Jordan;. *Water, air, and soil pollution*; 2000;121; 217-228.
- (20) Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR); Toxicological profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs); 1995; Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- (21) Pérez-Morales, G.; Morales, P.; Haza, A.I.; Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) (I): Toxicidad, exposición de la población y alimentos implicados; *Revista complutense de ciencias veterinarias*; 2016; 10(1); 1-15
- (22) International Agency for Research on Cancer (IARC). 2015. *Agents Classified by the IARC Monographs*, 1–113.
- (23) Decreto 109/2015, 17 de marzo de 2015, referente al Reglamento de vertidos al dominio público hidráulico y al dominio público marítimo-terrestre de Andalucía; BOE núm.89 pág. 22

(24)Directiva 2013/39/EU del Parlamento Europeo y del Consejo del 12 de agosto de 2013 por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas.

(25)Ming-Chi, W.; Jen-Fon, J.; Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples by microwave assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/flame ionization detection; *Talanta*; 2007; 72; 1269-1274.

(26)Rey, S.; Villacampa, B.; Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en aguas residuales y vertidos por SPE en línea y HPLC/DAD/FLD; *Cromatografía y técnicas afines*; 2016; 37; 3-21.

(27)Juanjuan, F.; Xiuqin, W.; Yu, T.; Yanan, B.; Chuannan, L.; Min, S.; Electrophoretic deposition of graphene oxide onto carbón fibers for in-tube solid-phase microextraction; *Journal of chromatography*;2017;1517;209-214.

(28)Tao, S.; Cui, Y.H.; Xu, F.L.; Dawson, R.; Li, B.G.; Determination of PAHs in wastewater irrigated agricultural soil using accelerated solvent extraction; *Journal of Environmental Science and Health*;2002; B37;141-150.

(29)Lehotay, S.J.; Son, K.A.; Kwon, H.; Koesukwiwat, U.; Fu,W.;Mastovska, K.; Hoh, E.; Leepipatpiboon, N.; Comparison of QuEChERS simple preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables; *Journal of Chromatography*;2010; 1217;2548-2560.

(30)Picó, Y.; Fernández, M.; Ruiz, M.J.; Font, G.; Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment; *J. Biochem. Biophys. Methods*; 2007; 70(2); 117-131.

(31)Beardy, R.P.; Pawliszyn, J.; The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns; *Water pollution Research journal of Canadá*; 1989;24;179-191.

(32)Vilela, F.; Cardeal, L.; Sampling of volatile organic compounds in air by solid phase microextraction; *Quim.Nova*; 2005; 28.

(33)Ríos Acevedo, J.J.; Nuevos desarrollos metodológicos en SPME; *Universidad complutense de Madrid*; 2017.

(34)<https://www.um.es/LEQ/Atmosferas/Ch-VI-1/C61s2p2.htm> (último acceso septiembre de 2019)

(35)Rubinson, K.A.; Rubinson, J.F.; Análisis instrumental; Perarson Educación S.A.; Madrid; 2001.

(36)http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CGInstrumentacion_26635.pdf (último acceso septiembre de 2019)

(37)Martín, M.C.; Ballesteros, M.; Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores; *Universidad complutense de Madrid*.

(38)Flores, C.; Espectrometría de masas de alta resolución y en tándem. Análisis de alto rendimiento de contaminantes orgánicos emergentes en agua; *Universidad de Barcelona*; 2015.

(39)https://www.researchgate.net/figure/The-Orbitrap-FT-mass-analyzer-In-the-Orbitrap-ions-oscillate-around-a-central_fig9_306542804 (último acceso septiembre de 2019)

(40)SANTE/11945/2015(30 Noviembre-1 Diciembre 2015)Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.

(41)EURACHEM Guide, Edition 1. "The fitness for purpose of analytical Methods: A laboratory guide to method validation and related topics". UK 1998.

(42)UNE-EN ISO 9001-2015, 2015.

(43)Dominguez, I.; Arrebola, F.J.; Gavara, R.; Martínez, J.L.; Garrido, A.; Automated and simultaneous determination of priority substances and polychlorinated biphenyls in wastewater using headspace solid phase microextraction and high resolution mass spectrometry; *Analytica Chimica Acta*;2018; 1002; 39-49

(44)Dominguez, I.; Arrebola, F.J.; Romero-González, R.; Nieto-García, A.; Martínez, J.L., Garrido, A.; Solid phase microextraction and gas chromatography coupled to magnetic sector high resolution mass spectrometry for the ultra-trace determination of contaminants in Surface water; *Journal of Chromatography*;2017;1518;15-24.

(45)Robles, J.; Gilbert, B.; García, J.F.; Molina, A.; Gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry method for monitoring multiclass organic pollutants in Spanish sewage treatment plants effluents; *Talanta*; 2013;111;196-205.

(46)Díaz, B.; Pintado, M.G.; Biel, M.; Rueda, J.J.; Lara, P.A.; Perales, J.A.; Manzano, M.A.; Garrido, C.; Martín, M.L.; Environmental risk assessment of effluents as a whole emerging contaminant: efficiency of alternative tertiary treatments for wastewater depuration; *Water Res*;2017;119;136-149.

(47)Hernández, F.; Ibáñez, M.; Portolés, T.; Cervera, M.I.; Sancho, J.V.;López, F.J.; Advancing towards universal screening for organic pollutants in waters; *J. Hazard. Mater*;2015;282;86-95.