

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



TESIS DOCTORAL

**UTILIZACIÓN DE SISTEMAS MOLECULARES ORGANIZADOS EN
LA EXTRACCIÓN Y PRECONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS
ORGANOCOLORADOS DE INTERÉS MEDIOAMBIENTAL Y SU
DETERMINACIÓN POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA
EFICACIA**

ARANTZAZU EIGUREN FERNÁNDEZ

Las Palmas de Gran Canaria, 2000



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS DOCTORAL

**UTILIZACIÓN DE SISTEMAS MOLECULARES ORGANIZADOS EN
LA EXTRACCIÓN Y PRECONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS
ORGANOCOLORADOS DE INTERÉS MEDIOAMBIENTAL Y SU
DETERMINACIÓN POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA
EFICACIA.**

ARANTZAZU EIGUREN FERNÁNDEZ

2000

U.L.P.G.C. Ciencias Básicas Biblioteca
Nº D.
Nº C.

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
DOCTORADO EN QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA Y MEDIO AMBIENTE

**UTILIZACIÓN DE SISTEMAS MOLECULARES ORGANIZADOS EN
LA EXTRACCIÓN Y PRECONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS
ORGANOCOLORADOS DE INTERÉS MEDIOAMBIENTAL Y SU
DETERMINACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA
EFICACIA.**

Tesis Presentada por Dña. Arantzazu Eiguren Fernández.

Dirigida por el Prof. Dr. José Juan Santana Rodríguez y codirigida por la Dra.
Zoraida Sosa Ferrera.

El Director

La Codirectora

La Doctoranda

Las Palmas de Gran Canaria, Febrero de 2000

**UTILIZACIÓN DE SISTEMAS MOLECULARES ORGANIZADOS EN
LA EXTRACCIÓN Y PRECONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS
ORGANOCOLORADOS DE INTERÉS MEDIAMBIENTAL Y SU
DETERMINACIÓN POR CROMATOLOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA
EFICACIA.**

Memoria presentada por la Licenciada en Ciencias del
Mar Dña. Arantzazu Eiguren Fernández para aspirar al
grado de Doctora en Química.

Las Palmas de Gran Canaria, Febrero de 2000

JOSÉ JUAN SANTANA RODRÍGUEZ, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DEL ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA Y ZORAIDA SOSA FERRERA CATEDRÁTICA DE ESCUELA UNIVERSITARIA EN EL ÁREA DE CONOCIMIENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

HACEN CONSTAR:

Que la presente Memoria titulada **"UTILIZACIÓN DE SISTEMAS MOLECULARES ORGANIZADOS EN LA EXTRACCIÓN Y PRECONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOCLORADOS DE INTERÉS MEDIOAMBIENTAL Y SU DETERMINACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA"** para optar al grado de Doctora en Química, ha sido realizada en los laboratorios de la Sección de Química Analítica del Departamento de Química de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria bajo nuestra dirección, autorizando con esta fecha su presentación y defensa.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en Las Palmas de Gran Canaria a 4 de Febrero de 2000

Fdo.: José Juan Santana Rodríguez

Fdo.: Zoraida Sosa Ferrera



Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

JORGE TRIANA MÉNDEZ, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD Y
DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE LA
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

CERTIFICO: Que la presente Memoria titulada "Utilización de sistemas moleculares organizados en la extracción y preconcentración de compuestos organoclorados de interés medioambiental y su determinación por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia" que presenta la Lcda. Dña. Arantzazu Eiguren Fernández para optar al grado de Doctora en Química por esta Universidad, ha sido realizada en los laboratorios de la Sección de Química Analítica del Departamento de Química. Tras su registro y trámite autorizados por el Departamento (20/1/98), autorizo con esta fecha su presentación.

Y para que así conste firmo el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria, a 2 de Febrero de dos mil.



AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar esta líneas para expresar mi agradecimiento a aquellas personas e instituciones que de un modo u otro han apoyado la realización de este trabajo.

En primer lugar quiero expresar mi gratitud a los Dres. D. José Juan Santana Rodríguez y Dña. Zoraida Sosa Ferrera, por la dirección y el apoyo que he recibido durante las diferentes etapas por las que ha transcurrido este trabajo.

Al Ministerio de Educación y Cultura por la Beca de Tercer Ciclo que ha permitido financiar este periodo de formación.

A la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria por ofrecerme los medios técnicos y materiales durante este tiempo.

A los profesores y personal integrante del Departamento de Química por la colaboración prestada a lo largo de todo este periodo.

A mis compañeros de laboratorio, por su apoyo a lo largo de estos años.

Y en especial a mi familia, a quienes agradezco profundamente el apoyo prestado, tanto emocional como económico, durante los años transcurridos desde el inicio de mi carrera hasta la finalización de este trabajo.

Esta Tesis Doctoral se ha desarrollado en el marco del Proyecto de Investigación de referencia PB94-0431, subvencionado por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (D.G.I.C.Y T.).

ÍNDICE

ÍNDICE	 i
INTRODUCCIÓN	3
1.- Bifenilos Policlorados (PCBs)	 5
1.1.- PCBs en el Medio ambiente	 8
1.2.- Técnicas de análisis	10
2.- Dibenzofuranos Policlorados (PCDFs)	11
2.1.- PCDFs en el Medio ambiente	13
2.2.- Técnicas de Análisis	15
3.- Surfactantes	16
3.1.- Clasificación de los surfactantes	17
3.2.- Características de los surfactantes	17
3.3.- Aplicaciones	 24
4.- Extracción por “Punto de Nube”	 27
5.- Extracción por Microondas	 36
6.- Objetivos del Trabajo	 40

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
1.- Caracterización de los Surfactantes	43
1.1.- Concentración micelar crítica	46
1.2.- Cálculo de la temperatura crítica a la que se produce el proceso de Punto de Nube	50
2.- Optimización del proceso de separación de fases en la metodología de extracción por Punto de Nube	54
2.1.- Variación de la concentración de surfactante en disolución	55
2.2.- Variación del volumen de surfactante añadido a la disolución	57
2.3.- Fuerza iónica del medio	59
2.4.- Otros factores	62
3.- Características Espectrofluorimétricas de los PCBs y los PCDFs en los diferentes medios micelares	63
4.- Optimización de la metodología de separación por Cromatografía Líquida	70
4.1.- Establecimiento de los parámetros que controlan la separación	71
4.2.- Características analíticas de los métodos de separación	75
4.2.1.- Tiempos de retención	75
4.2.2.-Curvas de calibrado	77

5.- Establecimiento de las condiciones óptimas de extracción por Punto de Nube	83
5.1.-Efecto del tiempo de equilibración en los porcentajes de recuperación	83
5.1.1.- Efecto sobre los PCBs	83
5.1.1.1.- Genapol X-080	84
5.1.1.2.- Brij 30	86
5.1.1.3.- Brij 56	87
5.1.1.4.- Brij 97	90
5.1.2.- Efecto sobre los PCDFs	91
5.1.2.1.- Genapol X-080	91
5.1.2.2.- Brij 56	93
5.2.- Efecto de la concentración de analito en disolución	94
5.2.1.- Efecto sobre los PCBs	94
5.2.2.- Efecto sobre los PCDFs	98
5.3.- Efecto de la concentración de surfactante en los porcentajes de recuperación	99
5.3.1.- Efecto sobre los PCBs	99
5.3.2.- Influencia en los PCDFs	101
5.4.- Evaluación estadística del método	103
5.5.- Porcentajes de recuperación	105
6.- Aplicaciones del proceso de extracción por Punto de Nube a muestras reales	110

7.- Optimización del proceso de extracción por microondas	121
7.1.- Efecto del pH en la disolución	121
7.1.1.- Efecto en la extracción de PCBs	122
7.1.2.- Efecto en la extracción de PCDFs	122
7.2.- Efecto de la concentración de surfactante en disolución	123
7.2.1.- Influencia sobre la extracción de PCBs	124
7.2.2.- Efecto sobre la extracción de PCDFs	124
7.3.- Efecto de la potencia de extracción	125
7.3.1.- Efecto sobre la recuperación de los PCBs	126
7.3.2.- Efecto sobre la recuperación de los PCDFs	128
7.4.- Influencia del tiempo de extracción sobre los porcentajes de recuperación	130
7.4.1.- Efecto sobre la extracción de los PCBs	130
7.4.2.- Efecto sobre los PCDFs	132
7.5.- Porcentajes de recuperación	133
7.6.- Evaluación estadística del método	137
8.- Aplicación de la metodología de extracción por microondas a muestras de sedimentos marinos	139
8.1.- Aplicación a sedimentos con presencia de PCBs	139
8.2.- Aplicación a muestras que contienen PCDFs	141
8.3.- Aplicación a muestras que contienen mezclas de PCBs y PCDFs	142

9.- Aplicación de la metodología de extracción por microondas a la extracción de PCBs y PCDFs en muestras de organismos marinos	149
9.1.- Optimización de la metodología de Extracción por Microondas para la determinación de PCBs	150
9.1.1.- Genapol X-080	150
9.1.2.- POLE	152
9.2.- Optimización de la metodología de Extracción por Microondas para la determinación de PCDFs	155
9.2.1.- Genapol X-080	156
9.2.2.- POLE	157
EXPERIMENTAL	161
1.- Aparatos utilizados	163
1.1.- Estudios fluorimétricos	163
1.2.- Estudios conductimétricos	163
1.3.- Determinación de la temperatura de "Punto de Nube"	163
1.4.- Extracción en muestras sólidas	163
1.5.- Determinación cromatográfica	164
2.- Reactivos y Disoluciones empleados	165
2.1.- Reactivos	165
2.2.- Disoluciones	165

3.- Procedimientos Operativos	166
3.1.- Obtención de los espectros de excitación y de emisión de los PCBs y PCDFs	166
3.2.- Determinación conductimétrica de la "concentración micelar crítica"	166
3.3.- Determinación de la Temperatura Crítica	167
3.4.- Determinación cromatográfica	167
3.5.- Acondicionamiento de las muestras acuosas	168
3.6.- Acondicionamiento de las muestras de sedimento	169
3.7.- Acondicionamiento de las muestras de organismos	169
3.8.- Extracción por Microondas	170
 CONCLUSIONES	171
 BIBLIOGRAFÍA	177
 PUBLICACIONES	189

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, muchas de las investigaciones químicas que se están realizando, tienen como finalidad el desarrollo de nuevas técnicas y metodologías de análisis que permitan la determinación de todas aquellas sustancias que tengan interés desde el punto de vista medioambiental, o que puedan tener repercusiones sobre la salud. Es por tanto necesario que las metodologías aplicadas nos permitan realizar análisis tanto cualitativos como cuantitativos de estas sustancias.

El principal problema que se plantea a la hora de desarrollar nuevas metodologías, es la baja concentración (partes por billón a inferiores) en la que pueden hallarse muchos de estos compuestos. Estas bajas concentraciones hacen que sea necesaria la utilización de procesos previos de preconcentración y extracción de los analitos para su posterior determinación. Pero además de las bajas concentraciones, existe un problema adicional en cuanto a la solubilidad de muchos de estos compuestos en el medio, debiéndose tener en cuenta a la hora de realizar los procesos de extracción y preconcentración.

La metodología clásica utilizada para la extracción y preconcentración de diversos compuestos incluye normalmente la solubilización de los mismos con disolventes orgánicos (extracción líquido-líquido) [1-3]. En esta técnica son necesarios grandes volúmenes de disolvente, y además nos encontramos con el problema de que muchos de los disolventes utilizados son también contaminantes. Estos dos handicaps aumentan la importancia de la necesidad de desarrollar nuevos métodos de preconcentración y extracción en los cuales no sea necesaria la utilización de dichos disolventes.

Existen otras metodologías que se han venido utilizando como alternativas. Durante los últimos años se ha generalizado el uso de compuestos

anfífilos sintéticos, más comúnmente conocidos como *surfactantes*, *tensoactivos* o *detergentes*. Los surfactantes presentan una gran selectividad a la hora de solubilizar los compuestos, lo que nos permite su utilización para la extracción y preconcentración de una gran cantidad de solutos (metales, compuestos orgánicos, etc.) [4-10]. Estos compuestos anfífilos permiten obtener buenos rendimientos en los diversos procesos de extracción sin que sea necesaria la utilización de disolventes orgánicos, con lo que se eliminan los posibles problemas de contaminación con la que nos encontrábamos, y por otra parte, permiten trabajar con medios acuosos que son menos tóxicos y a la vez más baratos. Hay que reseñar también, que los volúmenes de surfactante necesarios para el proceso son mucho más pequeños que los necesarios en la extracción con disolventes orgánicos.

La utilización de los surfactantes como extractantes, se basa en los diferentes equilibrios que se establecen entre los compuestos contaminantes y los sistemas coloidales presentes en el medio, así como en los procesos de adsorción-desorción que tienen lugar en las interfases sólido-líquido y gas-líquido [11-13]. La presencia de surfactantes en el medio favorece los procesos de desorción de los analitos adsorbidos en las diferentes formas particuladas que están presentes en el medio, y por tanto aumentando su solubilidad, lo que permite una mayor facilidad de extracción de los mismos. Además, los surfactantes permiten la concentración de los solutos en un volumen mucho más reducido que en el que se encuentran, con lo que podemos obtener diferentes factores de preconcentración.

Existen diversas metodologías que utilizan los surfactantes como extractantes, y el uso de una u otra depende del tipo de compuesto que se quiera determinar, así como del medio en el que se encuentre.

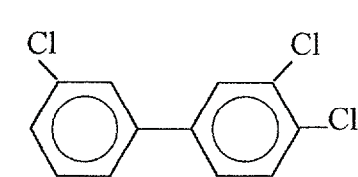
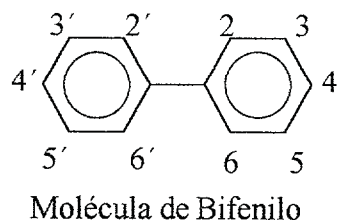
Una vez que los compuestos han sido extraídos, es necesaria su determinación, tanto cualitativa como cuantitativa. Existe gran variedad de

técnicas de análisis tanto para su separación previa como para su posterior detección. Las técnicas de separación y detección más utilizadas son la cromatografía líquida y la cromatografía de gases para compuestos orgánicos [14-16], así como otras técnicas alternativas [17,18], y UV-visible [19], absorción atómica [20] para los compuestos de tipo inorgánico.

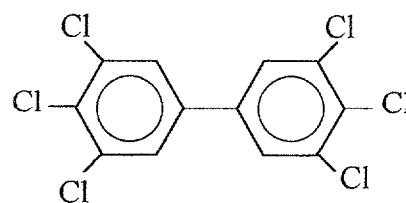
En el desarrollo del trabajo de la presente Tesis Doctoral se ha estudiado la utilización de medios micelares para la extracción y preconcentración de Bifenilos Policlorados (PCBs) y Dibenzofuranos Policlorados (PCDFs) tanto en muestras líquidas como en sedimentos y organismos marinos, aplicando como técnica para su separación y determinación la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detección por fluorescencia. La importancia de la determinación de estos compuestos radica en su alta toxicidad (son considerados cancerígenos) y su amplia distribución a lo largo de todo el planeta. Son compuestos cuyas características fisico-químicas implican una larga persistencia en el medio en el que se encuentren (atmósfera, agua, sedimentos u organismos), así como una elevada dificultad en su degradación tanto por procesos de carácter físico o químico, como por actividad biológica [21,22].

1.- Bifenilos Policlorados (PCBs)

Los Bifenilos Policlorados (PCBs) constituyen una familia de compuestos cuya unidad básica es el *bifenilo*. A esta unidad básica pueden unírsele de uno a diez átomos de cloro, con lo que la variedad de isómeros que pueden aparecer se eleva a 209. Estos compuestos pueden agruparse en 10 homólogos en función de la posición que ocupa el átomo de cloro dentro de la molécula base de bifenilo. Así, algunos ejemplos de estos compuestos se muestran en la Figura 1.



3,3',4- Triclorobifenilo



3,3',4,4',5,5'- Hexaclorobifenilo

Figura 1.- Molécula de Bifenilo y ejemplo de algunos PCBs.

Los PCBs estudiados en esta Tesis, así como algunas de sus características, se muestran en la Tabla I:

Tabla I. Bifenilos Policlorados

COMPUESTO	Fórmula	P.M. ^a	A ^b
Bifenilo	C ₁₂ H ₁₀	154.2	BF
4- Clorobifenilo	C ₁₂ H ₉ Cl	188.66	MBF
4,4'-Diclorobifenilo	C ₁₂ H ₈ Cl ₂	223.10	DBF
3,4,4'-Triclorobifenilo	C ₁₂ H ₇ Cl ₃	257.55	TriBF
3,3',4,4'-Tetraclorobifenilo	C ₁₂ H ₆ Cl ₄	291.99	TBF
3,3',4,4',5,-Pentaclorobifenilo	C ₁₂ H ₅ Cl ₅	326.44	PBF
3,3',4,4',5,5'-Hexaclorobifenilo	C ₁₂ H ₄ Cl ₆	360.88	HBF

a: Peso Molecular; b: abreviatura

La síntesis de estos compuestos fue descrita por Schmidt y Schultz en 1881, pero no fueron utilizados en procesos industriales hasta medio siglo después. La síntesis de los PCBs se obtiene mediante la cloración del bifenilo con gas cloro [23]. Debido a su alta resistencia al calor (son térmicamente muy estables), así como su resistencia a la oxidación y a agentes ácidos y básicos, y su alta constante dieléctrica, se comercializaron rápidamente e incluso se fabricaron como mezclas complejas denominadas de varias formas diferentes: Aroclor, Phenoclor, Clophen, Sovol, etc. Las áreas industriales en las que tuvo un mayor desarrollo fueron principalmente la eléctrica, de plásticos y pinturas, donde se utilizaban como parte integrante de gomas, asfalto, tinta para impresoras, etc.

También presentan actividad insecticida y fungicida, y aunque no hayan sido utilizados como pesticidas propiamente dicho, si constituyen parte de otros pesticidas comúnmente utilizados.

Tanto los PCBs como los Arocloros (mezclas de PCBs) han mostrado una gran variedad de efectos tóxicos, por lo que muchos países han reducido la producción de los mismos y se han determinado sus valores límite permisibles en la naturaleza [24]. Además, el descubrimiento de la amplia distribución de estos contaminantes en el medio ambiente, junto a su alto poder cancerígeno, ha llevado consigo que en algunos países se regule también su manufactura y distribución.

El primer trabajo donde se muestra la presencia de PCBs en el medio ambiente, fue presentado en 1966, pero hay que tener en cuenta que estos compuestos habían sido utilizados durante 40 años.

Debido a sus características de estabilidad física y química, producen graves problemas de contaminación ambiental [21,25]. Presentan también una elevada persistencia en el medio, la cual aumenta a medida que aumenta el número de átomos de cloro en la molécula.

Algunos estudios realizados indican que el grado de toxicidad de los PCBs no solo depende del número de átomos de cloro sino también de la posición que ocupan estos dentro de la molécula. Así por ejemplo, se pueden destacar el 3,3',4,4'-Tetraclorobifenilo, el 3,3',4,4',5-Pentaclorobifenilo y 3,3',4,4',5,5'-Hexaclorobifenilo, considerados como los congéneres más tóxicos [26], aunque se han venido investigando diversas vías para la síntesis de congéneres específicos desde 1974. Cabe reseñar que los congéneres que presentan estructura coplanar (átomos de cloro en las posiciones orto-), presentan el menor grado de toxicidad [27].

1.1.- PCBs en el Medio ambiente

Los PCBs han tenido una distribución global en el medio ambiente a lo largo del periodo de utilización de los mismos, y debido a su alta estabilidad (presentan un tiempo de residencia elevado) aún hoy de día pueden encontrarse en diversos medios. Las principales propiedades físicas de los PCBs, desde el punto de vista medioambiental, son su solubilidad (son fuertemente adsorbidos en distintas superficies) y la presión de vapor (determinará su mayor o menor grado de volatilización).

La aparición de PCBs en el medio ambiente puede ser debida a diferentes procesos, siendo algunos de ellos la degradación térmica de otros compuestos organoclorados (cloroalcanos, policlorododecanos, etc.[28]), las pérdidas que se producen en los transformadores térmicos y sistemas hidráulicos, etc.

Una vez los PCBs se encuentran en el medio, y teniendo en cuenta su fuerte carácter lipofílico, así como su posible actividad en los procesos enzimáticos de los organismos, pueden presentarse en el tejido humano [29], mamíferos terrestres y marinos [30,31], peces [32], así como en sedimentos y biota [33,34], aguas [26], pigmentos [35], etc. Algunos ejemplos se muestran en la Tabla II.

Tabla II.- Algunos ejemplos de presencia de PCBs en el medio ambiente^a

Matriz	Localización	Concentración
Aire	Zonas remotas Zona Urbana	20-50 pg/m ³ 0.5-20 ng/m ³
Agua	Océano abierto Costa Mediterránea	50-200 pg/l 1-15 ng/l
Sedimentos	Océano abierto Zona Mediterránea	50-150 pg/g 0.2-0.5 µg/g
Suelos	Zona abierta Zona industrial	50-100 pg/g 0.1-20 µg/g
Organismos: Peces Humanos	Océano Zona industrial	0.02-150 µg/g 10-60 pg/g
Alimentos (leche)	Zona industrial	0.01-0.4 µg/g

a) Ref. [36]

En el caso de los organismos vivos, el grado de toxicidad de los PCBs varía en gran medida de unas especies a otras dependiendo, probablemente, de la capacidad metabólica de cada uno, y de las diferencias fisiológicas que presentan (sexo, edad, etc.) [37].

Hay que reseñar que se han producido algunas catástrofes medioambientales debidas a la presencia de estos compuestos, como la ocurrida en 1986 en el Oeste de Japón por contaminación de alimentos, en el que algunos afectados presentaban una concentración de PCBs en sangre de 7 ng.ml⁻¹ [38], y la producida en el río Hudson (U.S.A.) originada por un vertido de PCBs de dos plantas de la General Electric, encontrándose una concentración de PCBs en el sedimento de 150 µg.g⁻¹.

1.2.- Técnicas de análisis

A la hora de elegir las técnicas de determinación de los PCBs hay que tener en cuenta una serie de parámetros como son [39]:

1. Límite de detección requerido.
2. Posibles interferencias.
3. Resolución que sea necesaria.
4. Precisión cuantitativa y cualitativa.
5. Disponibilidad de la instrumentación.
6. Tiempo de análisis y su coste.

A la hora de analizar estos compuestos, la *Cromatografía de Gases* permite una separación de la mayoría de los analitos estudiados, por lo que ha sido aplicada en diferentes laboratorios de analítica a lo largo de los últimos 30 años. Las ventajas que presenta son una cuantificación precisa y un grado de precisión adecuado. Como técnica alternativa está la *Cromatografía Líquida de Alta Eficacia*.

Una vez separados los diferentes PCBs la detección de los mismos puede realizarse por medio de diferentes detectores, siendo la *Espectrometría de Masas* la que mejores límites de detección permite, y por tanto se utiliza para la determinación de PCBs presentes en concentraciones traza. Además, los PCBs siguen modelos de fragmentación característicos lo que permite cierta facilidad a la hora de identificarlos mediante esta técnica. La estructura molecular de estos compuestos, permite la utilización de otras técnicas como la *Fluorimetría*, la *Espectroscopía UV-visible* y la *Espectroscopía Infrarroja (IR)*, ya que cada congénere presenta unas características propias en cuanto a espectros y a las longitudes de excitación y emisión requeridas. Hay que reseñar que existe una amplia bibliografía de espectros para los diferentes analitos. Cuando lo que interesa es la determinación precisa de la estructura de los diferentes componentes que aparecen en los Arocloros, se utiliza la *Resonancia Magnética*

Nuclear (RMN), existiendo una serie de datos ya tabulados para la mayoría de los mismos [40].

Pueden también utilizarse técnicas como la extracción por fluidos supercríticos [41] y técnicas de extracción líquido-líquido [2], seguidas de diferentes técnicas de detección como la espectrometría de masas, fluorescencia, etc.

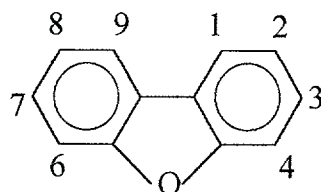
En esta Tesis se ha utilizado la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a un detector de fluorescencia. Las características cromatográficas y de fluorescencia correspondientes a los PCBs estudiados se muestran en la parte de resultados y discusión.

2.- Dibenzofuranos Policlorados (PCDFs)

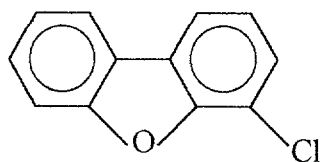
Los Dibenzofuranos Policlorados (PCDFs) son compuestos aromáticos clorados con una gran importancia medioambiental por su elevada toxicidad. La estructura molecular de los mismos consiste en una unidad básica de dos anillos bencénicos y un átomo de oxígeno (Dibenzofurano) a la cual se le pueden unir ocho átomos de cloro en diferentes posiciones, dando lugar a la aparición de 135 congéneres (Figura 2). Son compuestos hidrofóbicos, y además presentan problemas a la hora de solubilizarlos en disolventes comunes. También tienen carácter lipofílico, por lo que se encuentran sometidos a procesos de bioacumulación y biomagnificación en el medio ambiente. Debido a su alta estabilidad tienen altos tiempos de residencia en el medio, lo que permite su amplia difusión en los diferentes medios.

Estos compuestos son conocidos, al menos, desde 1872 cuando su síntesis fue realizada por químicos alemanes [42]. Sin embargo, como pueden producirse por combustión de algunos materiales, es posible que estos compuestos puedan haber existido en el medio ambiente desde el primer

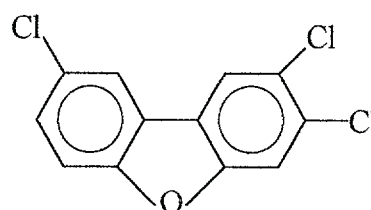
incendio de un árbol [43].



Molécula de Dibenzofurano



4-Monoclorodibenzofurano



2,3,8-Triclorodibenzofurano

Figura. 2.- Estructura de la molécula de Dibenzofurano y ejemplos de PCDFs.

Todos los Dibenzofuranos Policlorados son tóxicos, aunque el grado de toxicidad varía de unos a otros en función de su estructura. Así, dentro de ellos, aquellas moléculas con átomos de cloro en las posiciones 2,3,7,8 son los que mayores efectos cancerígenos y mutagénicos presentan, afectando a los sistemas reproductivos e inmunológicos de los animales [38,44]. Para hablar del grado de toxicidad relativo a estos compuestos, se han establecido unos Factores Numéricos de Equivalencia Tóxica (TEFs), que permiten la conversión de concentración de PCDFs en Equivalentes de Toxicidad (TEQ). Así, el TEF puede ser utilizado para transformar resultados analíticos en equivalentes tóxicos [45].

Los Dibenzofuranos Policlorados estudiados en esta Tesis, junto a su

fórmula y peso molecular se nombran en la Tabla III.

Tabla III. Dibenzofuranos Policlorados

COMPUESTO	Fórmula	P.M. ^a	A ^b
Dibenzofurano	C ₁₂ H ₈ O	168.0	DBFo
4- Monoclorodibenzofurano	C ₁₂ H ₇ OCl	202.5	1-CDF
2,8- Diclorodibenzofurano	C ₁₂ H ₆ OCl ₂	237.0	2-CDF
2,4,8-Triclorodibenzofurano	C ₁₂ H ₅ OCl ₃	271.5	3-CDF
2,3,7,8-Tetraclorodibenzofurano	C ₁₂ H ₄ OCl ₄	306.0	4-CDF
2,3,4,7,8-Pentaclorodibenzofurano	C ₁₂ H ₃ OCl ₅	340.5	5-CDF

a: Peso Molecular; b: abreviatura

2.1- PCDFs en el Medio ambiente.

Los PCDFs están ampliamente distribuidos y pueden encontrarse en diferentes medios. La introducción de los PCDFs en el medio ambiente, puede deberse a la degradación térmica de los PCBs [46,47], aunque principalmente está asociada a diferentes actividades de carácter antropogénico y biológico (estas últimas en menor medida), las cuales pueden agruparse en cuatro grandes grupos [47]:

- Procesos de producción química: manufactura de bifenilos policlorados (PCBs), herbicidas, pentaclorofenol.....
- Procesos de combustión: quema de basuras y residuos industriales, combustibles utilizados en ingeniería, etc.
- Reacciones de tipo fotoquímico: que tienen lugar durante el transporte aéreo de diversos compuestos, así como durante ciertos procesos de degradación.
- Procesos biológicos: la actuación de ciertos organismos en presencia de mezclas de clorofenoles, peróxido de hidrogeno, etc.

Los compuestos policlorados producidos durante los diferentes procesos de combustión, pasan principalmente a la atmósfera, desde donde son transportados a los medios acuáticos y terrestres, además de los posibles aportes directos que puedan tener estos últimos medios. Debido a sus propiedades hidrofóbicas y lipofílicas, lo que les confiere baja solubilidad en el agua, se adsorben fuertemente al material orgánico presente en el medio, lo que permite que sean ingeridos por los organismos y pasen a formar parte de la cadena trófica, donde se produce la acumulación de los mismos [22,42,43]. La presencia de estos compuestos en los sedimentos de una zona determinada puede dar cierta información sobre la evolución temporal que ha existido en el grado de contaminación, es decir, como ha variado la toxicidad de la zona. Por otro lado, la bioacumulación también puede ser de utilidad en cuanto a que nos aporta una información muy similar a la de los sedimentos sobre el grado de contaminación del medio en el que se encuentran.

Algunos ejemplos de concentraciones y presencia de PCDFs en el medio ambiente se muestra en la Tabla IV.

Tabla IV.- Algunas concentraciones de PCDFs en el medio ambiente^d

Tipo de Muestra	Compuesto	Concentración
Sedimentos Superficiales: Bahía Saginow Río Elbe (Alemania)	HpCDF ^a OCDF ^b	3.5 ng/g 56,6 ng/g
Río Rhin: Cerca de Dusseldorf	Total de PCDFs	9 ng/g
Río Housatonic (USA): Estanque Wood	TCDF ^c	27.6 ng/g
Mar Báltico Salmón	TCDF ^c	0.43-0.7 ng/g

a) Heptaclorodibenzofurano; b) Octaclorodibenzofurano; c) Tetraclorodibenzofurano

d) Ref. [50,51]

2.2.- Técnicas de análisis

La primera técnica utilizada para la determinación de estos compuestos apareció en 1966 y fue la cristalografía de rayos-X [47]. Posteriormente, y hasta los años 80, se hizo frecuente el uso de la cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC/ECD) [52], lo que permitió reducir los límites de detección. Una técnica posterior, y que viene siendo utilizada hasta la actualidad, es la cromatografía de gases junto a la espectrometría de masa (GC/MS) [53,54]. Esta metodología nos permite la determinación de PCDFs presentes en concentraciones a niveles traza. Aunque los límites de detección son mejores, esta técnica presenta diversos problemas cuando lo que se necesita es la identificación de isómeros de un mismo compuesto. Esto se debe a que los espectros que se obtienen, y que corresponden a cada uno de los diferentes isómeros, son similares. Por tanto, es necesaria una adecuada separación previa de todos los compuestos, incluyendo los isómeros, para una correcta determinación. Así, para solventar este problema se comienzan a utilizar nuevas técnicas de análisis, como son la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) [55] y la Cromatografía de Gases de Alta Resolución (HRGC), con las cuales se obtiene la separación necesaria para la identificación de todos los PCDFs [56,57]. Pero no solo el tipo de separación es importante en lo referido al análisis de compuestos. Las técnicas de detección acopladas a estos sistemas juegan también un papel importante. De ellas depende no sólo el límite de detección obtenido, sino también la facilidad con la que se puede identificar cada uno de los compuestos en estudio. La utilización de una u otra, viene determinada por el tipo de muestra a analizar, así como del tipo de sistema de separación previo. Algunas de las técnicas se basan en las características que presentan los anillos bencénicos de la molécula, siendo las más utilizadas la detección por fluorescencia [58,59], detección UV-visible [60,61], IR, etc.

Como complemento a estas técnicas, pueden utilizarse también procesos previos de lavado y extracción, como pueden ser extracción con disolventes orgánicos, extracción en fase sólida, extracción con microondas, etc. Estos procesos permiten la eliminación de la muestra de aquellos analitos no deseados y que interfieren con los PCDFs, o bien la preconcentración de los analitos en estudio, para un mejor análisis. En algunos casos, también se utilizan varios espectrómetros de masa en tandem (MS-MS).

La técnica utilizada en esta Tesis, para la determinación de PCDFs ha sido la HPLC junto a un detector de fluorescencia.

3.- Surfactantes

Los surfactantes (contracción de los términos ingleses “surface”, “active”, “agents”) son sustancias cuya estructura molecular presenta dos grupos con carácter diferente: un grupo no polar (lío-fílico o hidrofóbico) y otro polar o iónico (hidrofílico o lipofóbico). Esta característica se denomina “anfipática”. Dentro de esta estructura, el grupo hidrofóbico, que es generalmente una cadena hidrocarbonada, se denomina “cola”, mientras que el grupo hidrofílico es llamado “cabeza” (Figura 3). Esta estructura anfipática causa no sólo la concentración del surfactante en la superficie y la reducción de la tensión superficial del agua, sino que esta estructura peculiar también aporta a los surfactantes la propiedad de adsorberse en las superficies e interfases de un sistema, entendiéndose por “interfase” la unión entre dos fases inmiscibles, y por “superficie” la interfase en la cual una de las fases es un gas, generalmente aire.

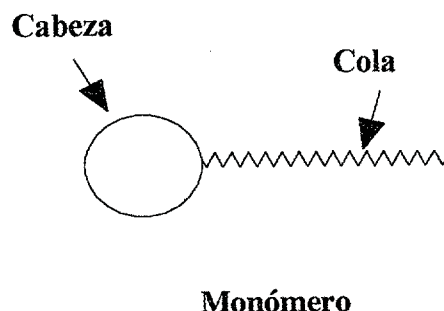


Figura 3.- Estructura de una molécula de surfactante.

3.1.- Clasificación de los surfactantes

Dependiendo de la naturaleza del grupo hidrofílico los surfactantes se clasifican en cuatro grupos principales [62]:

- a) **Catiónicos:** el grupo hidrofílico posee carga positiva como, por ejemplo, las sales de amonio cuaternarias.
- b) **Aniónicos:** el grupo hidrofílico tiene carga negativa, como por ejemplo las sales de ácidos alquil carboxílicos o sulfónicos.
- c) **Zwitteriónicos:** en el surfactante existen grupos con carga positiva y negativa. Estos surfactantes presentan propiedades muy parecidas a los no iónicos. Un ejemplo lo constituyen los aminoácidos.
- d) **No iónicos:** el surfactante no posee grupos con carga, como por ejemplo los monoglicéridos.

3.2.- Características de los surfactantes.

En disoluciones muy diluidas, los surfactantes suelen encontrarse como monómeros, dímeros, trímeros, etc. Pero si la concentración de la disolución aumenta, puede llegar a alcanzarse un punto en el cual se produce un proceso de agregación, a partir del cual aparecen variaciones en las propiedades físico-químicas de la disolución. El agregado coloidal que se forma recibe el nombre

de “micela” y la concentración a partir de la cual se forman se denomina “concentración micelar crítica” (c.m.c.), siendo característica de cada surfactante. De ahí que a las disoluciones donde encontramos surfactante también se les denomine “medios micelares”. El número de moléculas de surfactante que pueden formar la micela varía dependiendo de las condiciones en las que se encuentre el surfactante, y se le denomina “numero de agregación”(N).

La formación de micelas es el resultado de la actuación de fuerzas contrarias, siendo la principal el efecto hidrofóbico. Las micelas presentan el grupo hidrofóbico orientado hacia el interior de la misma (“corazón”) y el grupo hidrofílico hacia el disolvente (exterior de la micela). Esta estructuración de los grupos de la molécula permite eliminar la interfase hidrocarbano-agua, siendo además energéticamente favorable (se logra el estado de mínima energía libre) [63-65]. Por otro lado, la forma y el tamaño de la micela vienen controlados por las fuerzas de repulsión que aparecen entre los grupos hidrofílicos. Por consiguiente, la formación de micelas y la concentración de surfactante a la que se producen, depende del balance entre los factores que favorecen la micelación y los que se oponen a ella. Las micelas pueden ser: esféricas, ovaladas, elipsoidales, cilíndricas, etc. (Figura 4).

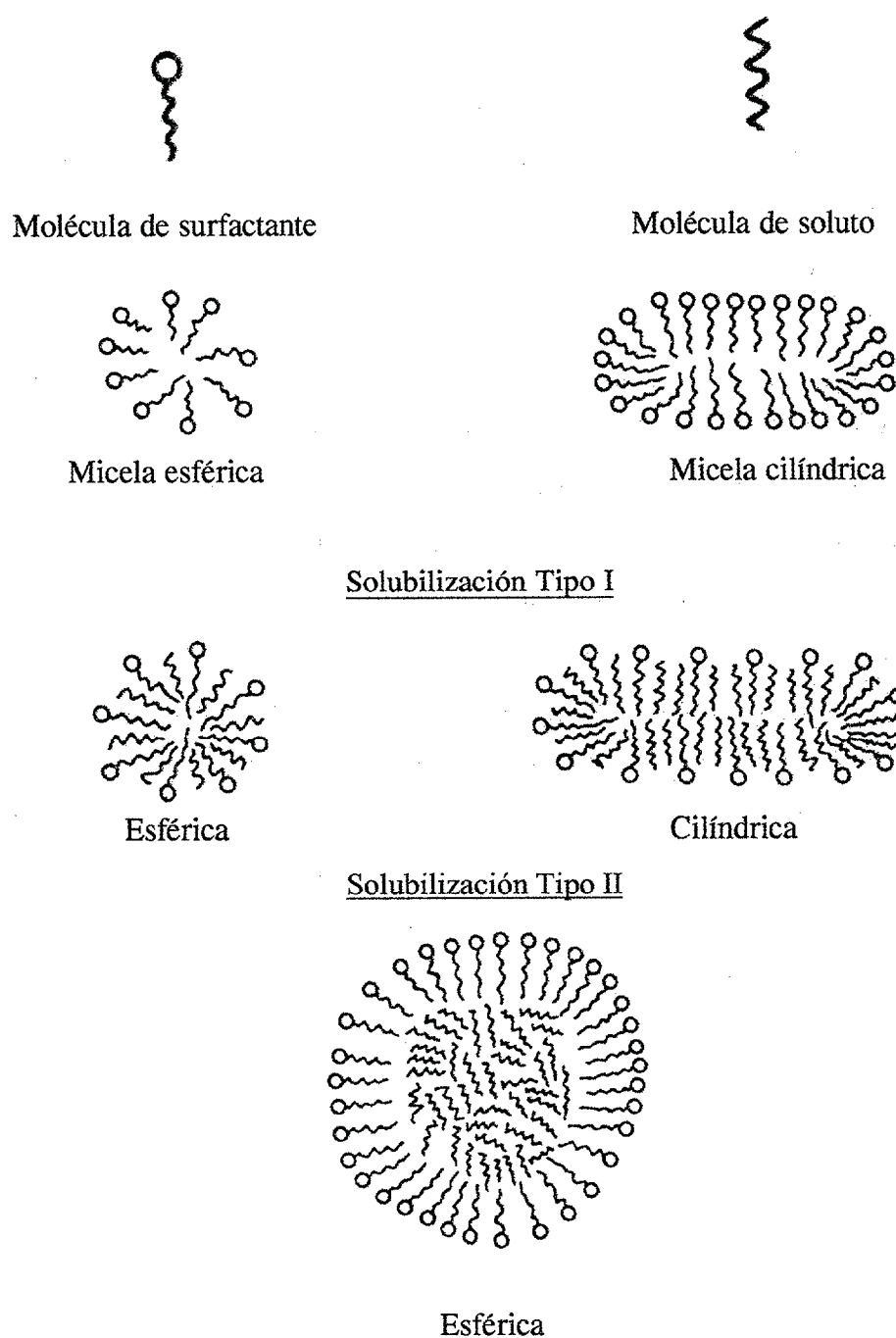


Figura 4.- Representación esquemática de micelas puras y micelas que contienen soluto. Para la solubilización de Tipo I las moléculas de soluto se colocan entre las colas de la micela; para el Tipo II las moléculas de soluto se colocan en el interior de la micela (corazón) [65].

En cuanto al tamaño, el número de moléculas de surfactante que forman las micelas se halla en un rango entre 50 y 100 [64-66]. Existen algunos modelos que explican la forma que tendrían las micelas, pero este tema sigue estando sujeto a controversia. Hay que destacar que, en general, las micelas compuestas de surfactantes no iónicos suelen tener concentraciones micelares críticas menores y números de agregación más altos que las micelas iónicas análogas [67].

En la Tabla V se recogen ejemplos de estos cuatro tipos de surfactantes y los valores de algunos de sus parámetros característicos.

Pero las micelas no sólo aparecen cuando el surfactante se encuentra en un medio acuoso. Se ha comprobado que la formación de micelas también se observa en medios orgánicos no polares. En estos casos las micelas reciben el nombre de “*micelas inversas*”, y la estructura presenta a los grupos hidrofílicos localizados en el interior del agregado, mientras que las cadenas hidrofóbicas se extienden hacia la fase no polar [66,70]. Normalmente estas micelas inversas presentan un comportamiento similar a las micelas normales, pero para algunos surfactantes no se observa un claro momento en el que se sobrepasa la c.m.c. sino que al aumentar la concentración de surfactante en el medio, las micelas inversas adquieren un mayor tamaño y se postula que presentan una estructura laminar en algunos momentos. Este tipo de micelas se utiliza principalmente en la extracción de proteínas y péptidos [71,72].

Las micelas no son sistemas estáticos, como puede suponerse en un principio, sino que ellas y los solutos asociados a las mismas están en equilibrio dinámico con el medio que las rodea [73]. Las moléculas de surfactante entran y abandonan la micela en microsegundos. Estos monómeros y los solutos asociados pueden ser sustituidos por otros presentes en la disolución, en otras micelas o adsorbidos en otras superficies. La disolución completa y la redistribución de una micela pueden ocurrir en milisegundos [69,74].

Tabla V.- Relación de sistemas micelares y parámetros característicos^{a,b,c}

NOMBRE	c.m.c. ^a	N ^b
CATIÓNICOS:		
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio	9.2×10^{-4}	61
Bromuro de tetradeciltrimetilamonio	3.5×10^{-2}	75
Cloruro de dodecilamonio	1.5×10^{-2}	55.5
Cloruro de hexadecilpiridinio = cloruro de cetilpiridinio	9.0×10^{-4}	95
Cloruro de bencildimetiltetradecilamonio	3.7×10^{-4}	-
ANIÓNICOS:		
Tetradecil sulfato de sodio	2.1×10^{-3}	80
Dodecilsulfato de sodio = laurilsulfato de sodio	8.1×10^{-3}	62
4-Dodecibencenosulfonato de sodio	1.6×10^{-3}	24
Dodecilsulfonato de sodio	9.8×10^{-3}	54
Dodecanoato de sodio	2.4×10^{-2}	56
Perfluoroheptanoato de sodio	2.8×10^{-2}	-
ZWITTERIÓNICOS:		
N-Dodecilbetaina	1.5×10^{-3}	73
N-Dodecilsultaina	3.3×10^{-3}	55
NO IÓNICOS:		
Polioxietileno 6-dodeciléter	8.7×10^{-5}	400
Polioxietileno 23-dodeciléter	5.5×10^{-5}	40
Polioxietileno 7-hexadeciléter	1.7×10^{-6}	594
Polioxietileno 12-hexadeciléter	7.5×10^{-5}	152
Polioxietileno 10-nonilfeniléter	7.5×10^{-5}	276
Polioxietileno 23-dodecanol (Brij-35)	9.0×10^{-5}	40
Polioxietileno 9,5-p-t-octilfenol (Tx-100)	3.0×10^{-4}	143

a) c.m.c.: concentración micelar crítica; b) N: Número de agregación

c) Ref. [68,69]

Además de las micelas, los surfactantes pueden presentar otro tipo de agregados como las “*sales biliales*”, las “*vesículas*” [65], y las “*microemulsiones*” [66,75].

Las “*sales biliales*” son moléculas biológicas muy importantes, que actúan como las moléculas de detergente. Se caracterizan por presentar una doble cara, es decir, una cara hidrofóbica y otra hidrofílica. Esto hace que muestren un comportamiento diferente a la hora de formar agregados. El proceso de agregación consiste en un primer paso en el que 2-8 monómeros se unen mediante interacciones hidrofóbicas producidas entre las caras no polares de las moléculas, para formar las micelas iniciales. Posteriormente, a concentraciones más elevadas, estas micelas primarias se unen entre sí para dar lugar a lo que llamamos sales biliales secundarias, adquiriendo un mayor tamaño y una forma de varilla cilíndrica que se debe a los enlaces de hidrógeno intermoleculares establecidos entre los diferentes grupos hidroxílicos [76].

Las “*vesículas*” son estructuras que presentan dos o más capas, y que se forman cuando un surfactante, normalmente de cadena dialquílica larga, se añade a una disolución acuosa, la cual se sonica a una temperatura superior a la que se produce su separación de fases. Estas vesículas son de mayor tamaño y presentan menor movilidad, es decir, son más estáticas, que las micelas. Además, una vez formadas no pueden destruirse nuevamente por dilución.

Se conoce por “*microemulsiones*” a los sistemas que contienen tres componentes: agua, el surfactante, y un disolvente orgánico no polar. Presentan características propias como son la formación de estructuras esféricas o bicontinuas en el rango de los nanómetros y una rápida dinámica de formación y separación de las estructuras. Pueden ser utilizadas como una pseudofase singular de disolvente, o como disolvente de dos fases que consiste en una fase de microemulsión y una fase acuosa u orgánica. La capacidad de

solubilización de estos sistemas viene determinado por la adsorción que puede producirse en la superficie de las estructuras [75].

En presencia de micelas, los contaminantes orgánicos e inorgánicos que se encuentran en el medio interactúan con estos agregados, pudiendo unirse a la micela en diferentes regiones de la misma dependiendo de la naturaleza del soluto y del surfactante [65]. La fuerza de unión entre el soluto y el surfactante depende de las interacciones electrostáticas, de los puentes de hidrógeno presentes, y/o de las interacciones hidrofóbicas que existan bajo las condiciones experimentales de trabajo [64,65]. Además, hay que tener presente, que la repartición del soluto entre el disolvente y las micelas de surfactante viene caracterizado por ser un proceso de equilibrio dinámico, definido por un coeficiente de partición “P”. Este coeficiente de partición se define como la relación entre la concentración de soluto en la fase micelar y aquella en la fase principal de la disolución.

$$P = \frac{[\text{Solute}] \text{ en fase micelar}}{[\text{Solute}] \text{ en el disolvente}}$$

El factor principal que debe tenerse en cuenta, a la hora de utilizar con éxito los medios micelares en la separación de compuestos, es su capacidad selectiva y de interacción con los compuestos de interés.

Cuando se desea determinar la presencia de surfactantes en un medio, así como su interacción con los solutos pueden utilizarse diferentes metodologías de análisis, como pueden ser la fluorescencia [77,78], la valoración por inyección de flujo [78], etc.

3.3.- Aplicaciones

Se ha destacado la importancia de los medios micelares en la solubilización de especies químicas, pero también hay que mencionar su intervención en otros procesos, como pueden ser: el desplazamiento de equilibrios y la modificación de cinéticas de reacción así como en cierto grado la naturaleza de los productos, alteración de parámetros físico-químicos de determinados iones y moléculas que afectan a mediciones electroquímicas, procesos de radiación visible-UV, aumento de la fluorescencia y fosforescencia, espectroscopía de llama y plasma, o en procesos de extracción, cromatografía en capa fina o líquida de alta eficacia [76,79-82].

Algunos ejemplos de estos efectos se muestran en la Tabla VI.

Tabla VI.- Efectos producidos por la presencia de medios micelares en diferentes metodologías^a

TÉCNICA	ANALITO	SURFACT.	EFFECTOS
Potenciometría	Ácidos grasos, sulfonamidas, halófenoles	HTAB, HPC	pK _a mas bajo
Polarografía	Moléculas orgánicas, complejos metálicos	Catiónicos, aniónicos	Cambio de los potenciales formales, enmascaramiento selectivo
Espectrofotometría UV – visible	Iones metálicos (complejos metalocrómicos aniónicos)	Catiónicos	Cambio de los máximos de absorción, aumento de la absortividad
Fluorescencia	Complejos metal-quelato	SDS, HTAB, no iónicos	Mayor sensibilidad, protección frente al quenching
Fosforescencia	Compuestos aromáticos	SDS/TI dodecil sulfato	Emisión a temperatura ambiente, mayor sensibilidad
Fotometría de llama y plasma	Iones metálicos	SDS	Mejor distribución del analito, supresión de interferencias

a) Ref. [83]

Los medios micelares también se han utilizado en separaciones analíticas, destacando su importancia en tres campos: procesos de extracción, cromatografía y separaciones electrocinéticas, y otras aplicaciones:

- a) Procesos de Extracción: las micelas poseen la capacidad de solubilizar diferentes compuestos, lo que permite extraer los substratos o complejos insolubles del medio acuoso, en una fase de menor volumen que está formada casi enteramente por surfactante. Así, la técnica de separación por medio de la extracción permite, por un lado, la purificación de las muestras, y por el otro la mejora de los métodos analíticos al aumentar tanto la sensibilidad como la selectividad. Existe una gran variedad de posibles esquemas para la extracción mediante surfactantes, dependiendo de la naturaleza de los analitos y del surfactante utilizado, que podemos clasificar en dos grandes grupos: utilización de surfactantes en disolventes orgánicos para la extracción de enzimas extracelulares [84], proteínas [85], metales [86,87], etc., y aquellos que utilizan soluciones acuosas. En este último grupo podemos trabajar mediante la utilización de micelas normales, como por ejemplo, para el aislamiento y purificación de compuestos bioquímicos y componentes de membrana [88,89], y la extracción por separación de fases (metodología de “punto de nube” [6,90,91] y separación por coacervados [85]).
- b) Separaciones cromatográficas: la utilización de surfactantes para separaciones cromatográficas se basa en la interacción selectiva que presentan estos compuestos con los diferentes solutos. Así, los surfactantes pueden ser utilizados de dos formas diferentes: como fase móvil en cromatografía de capa fina [92], cromatografía líquida de alta eficacia [93] y filtración con gel [94], o como fase estacionaria (fase pseudo-estacionaria en cromatografía micelar electrocinética, o fase inmovilizada) [95]. Los medios micelares fueron incluidos en estas

técnicas como sustituyentes de los disolventes orgánicos, con la finalidad de eliminar las posibles repercusiones medioambientales que presentan estos disolventes. Por otra parte, la utilización de medios micelares como fase móvil tiene como ventajas adicionales una mayor seguridad, facilidad de disposición de los mismos, carácter biodegradable, mayor versatilidad, bajos costes y mayor selectividad [68]. La cromatografía en capa fina, nos permite también, caracterizar los coeficientes de partición y/o las constantes de unión de los solutos a las micelas. Algunos problemas que plantea esta técnica son: el número limitado de fases estacionarias que pueden ser utilizadas, y la dificultad en identificar las manchas debido a la presencia de surfactante. En cuanto a la cromatografía líquida, se encuentra que la utilización de surfactantes como fase móvil presenta como ventaja principal la buena resolución que podemos obtener, debido a que la micela puede interactuar con el soluto mediante interacciones tanto electrostáticas como hidrofóbicas.

- c) Otras aplicaciones: los surfactantes también pueden aplicarse en metodologías de separación por ultrafiltración [96] y en membranas líquidas de surfactante [66]. La utilización de surfactantes en la separación por ultrafiltración se basa en la asociación de los solutos con las micelas y la separación posterior de las mismas haciendo pasar la solución a través de una membrana de ultrafiltración. Esta membrana debe cumplir dos condiciones: primero, debe ser lo suficientemente pequeña para bloquear los agregados minerales, y segundo, debe ser suficientemente grande como para permitir un flujo aceptable. Normalmente esta técnica se aplica para la determinación de iones metálicos, mediante la utilización de ligandos hidrofóbicos que han sido incorporados en las micelas. Debido a esto, es una técnica que puede llegar a tener muchas aplicaciones industriales [83].

En cuanto a la utilización de los medios micelares como membranas líquidas de surfactante, hay que destacar que comenzó a aplicarse hacia 1960, y desde entonces se han convertido en una técnica muy popular para aislar y purificar una gran variedad de analitos. En esta técnica, el surfactante actúa como vehículo de transporte, pudiendo aparecer en forma de monómeros actuando como par iónico o agente de transferencia entre las fases. Así, podemos utilizarla para la separación de hidrocarburos, recuperación de aminas, fenoles y ácidos orgánicos presentes en aguas residuales, y en la separación y recuperación de iones metálicos. Actualmente, se está aplicando la membrana líquida de surfactante en el aislamiento y purificación de proteínas y enzimas.

4.- Extracción por metodología de “Punto de Nube”

Las bases de la técnica de extracción por separación de fases derivan del fenómeno de fases que presentan algunas soluciones micelares. Así, cuando se alteran las condiciones del medio (temperatura, presión, adición de sales, etc.) se produce la separación de la disolución acuosa micelar en una fase concentrada que contiene la mayor parte del surfactante, denominada “*fase rica en surfactante*”, y una fase acuosa diluida que contiene bajas concentraciones de surfactante. De esta manera, cualquier soluto presente en la disolución original que se encuentre unido a los agregados micelares puede ser extraído y concentrado en un volumen mucho mas pequeño correspondiente a la fase rica en surfactante [97].

El proceso a seguir para obtener la extracción de los analitos mediante separación de fases, está formado por los siguientes pasos: primero, la adición de surfactante a la disolución que contiene los compuestos de interés, permitiendo que se produzca la interacción entre los mismos y las micelas; segundo, la alteración de las condiciones del medio, con lo que se producirá la

separación de las fases; y por último, la extracción de la fase rica en surfactante, que contiene los analitos. Este último paso puede verse ayudado si la muestra es centrifugada (Figura 5).

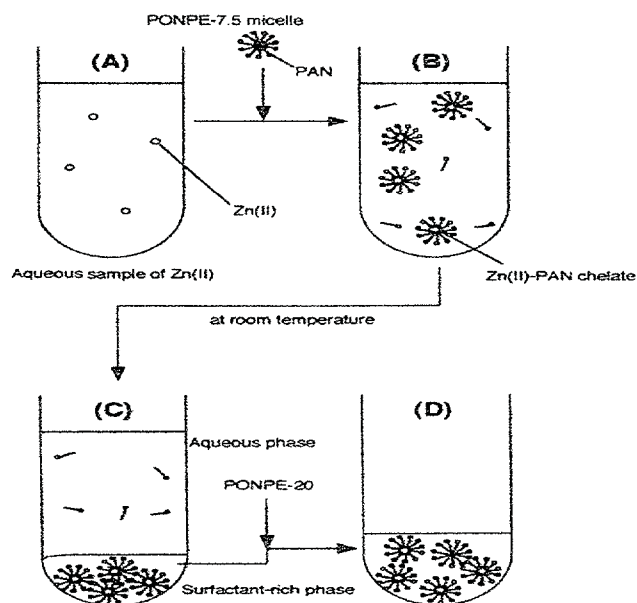


Figura 5.- Representación esquematizada de la separación de fases. Ejemplo de complejación de Zn con PONPE-20 [98]

El fenómeno de separación de fases puede obtenerse en casi todas las soluciones micelares, independientemente del tipo de surfactante, alterando las condiciones del medio. Para que se produzca la separación de fases es necesario que la concentración de surfactante en la disolución supere la concentración micelar crítica.

Normalmente el fenómeno de extracción por "punto de nube" se produce en aquellas soluciones acuosas que contienen surfactantes no iónicos. En estos casos, cuando la temperatura de la disolución acuosa que contenga un

surfactante no iónico en concentración superior a la c.m.c. aumenta, llega un momento en el que la disolución se vuelve turbia, y es esto lo que recibe el nombre de “*punto de nube*”. Por encima de esta temperatura el sistema se separa en dos fases isotrópicas: la fase rica en surfactante y la fase acuosa. La separación de fases obtenida en este proceso es reversible y por tanto, al enfriarse las dos fases vuelven a mezclarse dando lugar a la disolución original (Figura 6) [99].

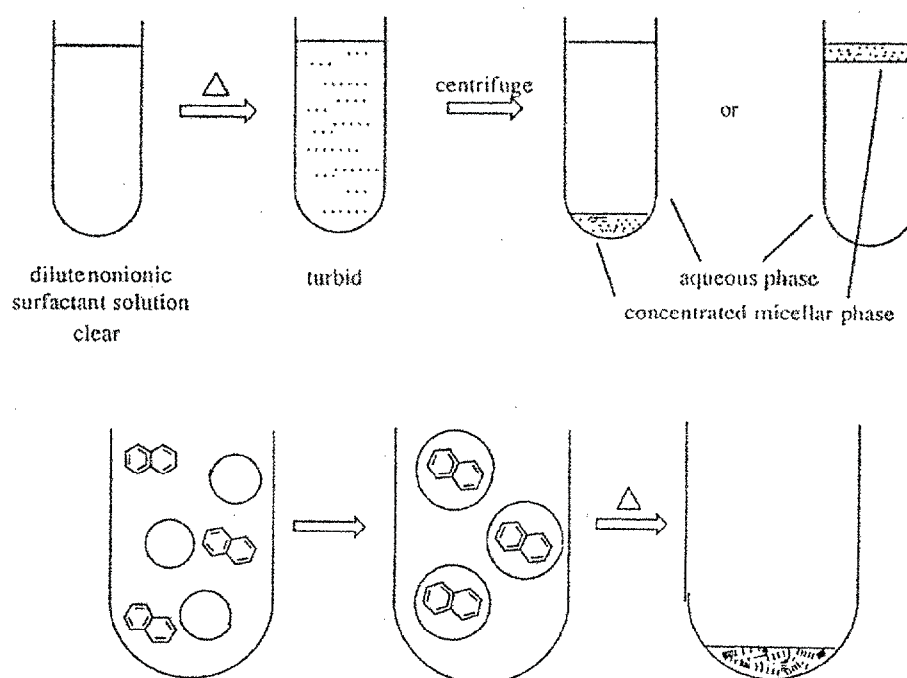


Figura 6.- Representación pictórica de los pasos que tienen lugar en la separación de fases (superior), y proceso de extracción por "Punto de Nube" para un analito (inferior).[99]

Pero el proceso de “punto de nube” no aparece solamente en presencia de surfactantes no iónicos. En la actualidad se ha observado este fenómeno en

disoluciones que contienen surfactantes de carácter aniónico [100]. En estos medios, la separación se obtiene en condiciones ácidas a temperatura ambiente.

El fenómeno de separación por “punto de nube” se debe a la disminución de la solubilidad del surfactante en la disolución acuosa como consecuencia del aumento de la temperatura de la disolución. La temperatura a la que se observa este fenómeno va a depender, principalmente, de la concentración de surfactante en la disolución; por tanto, si representamos gráficamente la temperatura a la que ocurre la separación de fases frente a la concentración de surfactante en disolución, obtenemos una gráfica denominada “*diagrama de fases*”, donde podemos ver por un lado la zona donde encontramos una sola fase (L), y por otro lado la zona con dos fases (2L). La curva obtenida, y que nos separa estas dos regiones se denomina “*curva de coexistencia*”. Al punto mínimo de esta curva se le denomina “*punto crítico*”, y a la temperatura y concentración a la que ocurre se les denomina “*temperatura crítica*” (T_c) y “*concentración crítica*” (C_c) respectivamente. La curva de coexistencia típica de los surfactantes no iónicos, así como las dos regiones que separa (L y 2L), se muestra en la Figura 7. Hay que reseñar, que este tipo de curva se obtiene para concentraciones de surfactante en disolución que no exceden de 1.0 M (aunque depende de la naturaleza del mismo), pudiendo presentarse curvas más complejas para concentraciones elevadas de surfactante (se observa la aparición de fases anisotrópicas, cristales líquidos, etc.).

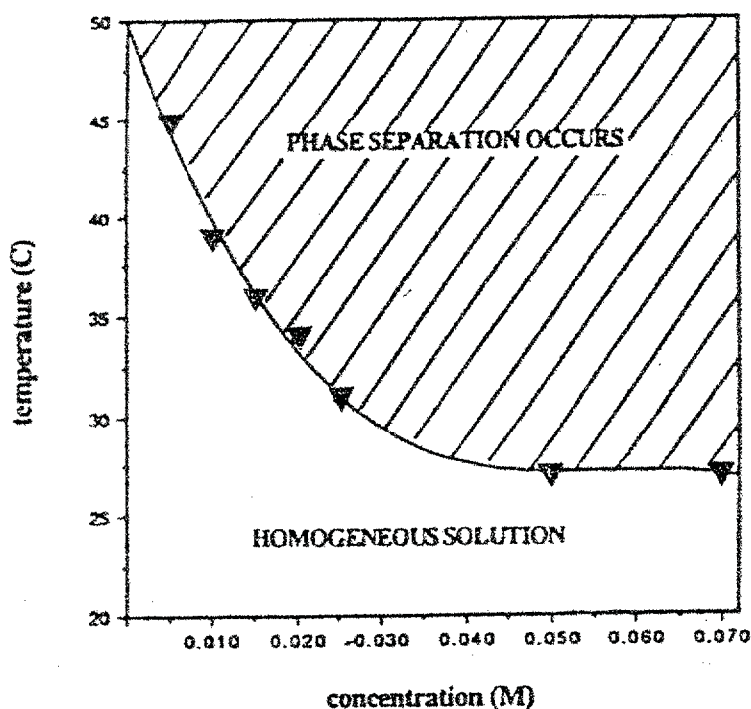


Figura 7.- Diagrama de fases típico de surfactantes no iónicos [97]

Se ha mencionado previamente que la temperatura a la que se observa el fenómeno de “punto de nube” depende de la concentración de surfactante, pero también hay que tener presente la estructura del mismo, puesto que ésta juega un papel importante en el proceso; así, por ejemplo, para una serie homóloga de surfactantes no iónicos con cadena polioxietilénica, la temperatura aumenta con la disminución de la longitud de la cadena hidrocarbonada y el aumento de la cadena oxietilénica [97]. De esta forma, conociendo la estructura de la molécula de surfactante podemos predecir también de una forma teórica el fenómeno de “punto de nube” [101,102]. Algunos estudios realizados sugieren que los surfactantes más adecuados para la extracción mediante el fenómeno de “punto de nube” son aquellos con características relativamente hidrofóbicas (para maximizar la eficiencia de extracción) y una relación de volúmenes de

fase pequeña (se maximiza la capacidad de concentración) [94].

Pero además de la estructura del surfactante hay otros factores que pueden tener influencia sobre el fenómeno de “punto de nube”, es decir, sobre la temperatura a la cual se observa este fenómeno. Estos factores afectan a la concentración micelar crítica y por tanto a la separación de fases. Dentro de estos factores cabe citar:

- a) *Adición de sales*: la adición de sales inertes provoca un aumento en la densidad de la fase acuosa, lo que repercute en una disminución de la temperatura necesaria para que se produzca el proceso de “punto de nube”. Esto es debido a que facilita el proceso de separación [103-105]. Por tanto, si consideramos la variación del pH de la disolución, como debida a la concentración de sales en el medio, se observará una variación de la temperatura del “punto de nube” al variar el pH de la disolución [106].
- b) *Presencia de compuestos orgánicos*: la adición de un co-surfactante produce un aumento de la c.m.c., pero sólo cuando sobrepasa una cierta proporción. Esto se debe a que la presencia de concentraciones elevadas de compuestos como el benceno o el etanol, dificultan la formación de los agregados micelares siendo necesarias mayores concentraciones de surfactante para que se formen. Pero a bajas proporciones la adición de un alcohol de cadena corta favorece la separación de fases [106,107] mientras que un aumento de la cadena hidrocarbonada incrementa la temperatura [106].
- c) *Variación de la presión*: en diferentes estudios se ha determinado que un aumento de la presión causa un aumento de la temperatura del proceso de “punto de nube” [13,108].
- d) *Presencia de otros surfactantes*: cuando la disolución contiene dos o más surfactantes no iónicos, la temperatura necesaria para que se produzca la separación de las fases es una temperatura intermedia, es

decir, está comprendida entre las temperaturas críticas de cada surfactante por separado [109]. También se producen variaciones cuando a la disolución se le añaden ciertas cantidades de surfactantes iónicos. En este caso, cuando tenemos mezclas de surfactantes iónicos y no iónicos, se observa un aumento de la temperatura a la que tiene lugar el proceso, debido a la formación de las denominadas micelas mixtas. Estas micelas contienen moléculas tanto del surfactante iónico como del no iónico, actuando estas últimas como solubilizadores de las moléculas del surfactante iónico, con lo cual la temperatura necesaria para producir la disminución de la solubilidad de estas micelas es mayor [110].

Hasta ahora hemos hablado de los factores que afectan al proceso de “punto de nube” como tal, es decir, aquellos factores que afectan a la c.m.c. principalmente. Pero existe también otra serie de parámetros que pueden afectar a los procesos de solubilización de los diferentes analitos en la disolución micelar, y que por tanto tendrán influencia en los porcentajes de recuperación (eficiencia del proceso) obtenidos al aplicar la extracción por “punto de nube”. Los parámetros más importantes son:

- a) *Tiempo y temperatura de equilibración*: el tiempo de equilibración se conoce como el tiempo que permanece la muestra bajo las condiciones en las que se establece la separación de fases. Este tiempo puede afectar a los porcentajes de recuperación del proceso en cuanto a que se alteran, en mayor o menor medida, las condiciones en las que se produce la interacción entre el soluto y la micela (al variar el tiempo se permite la existencia de diferentes interacciones soluto-micela), y por tanto, en función de este tiempo se podrán obtener mejores o peores porcentajes de recuperación [98]. Independientemente del tiempo que se establezca para el proceso, la

temperatura de equilibración debe estar siempre por encima de la temperatura de “punto de nube” para que tenga lugar la separación de las fases. En función del tipo de surfactante utilizado y del analito que se quiere extraer, el efecto del tiempo de equilibración variará, y el comportamiento de los analitos frente al mismo también se verá alterado.

- b) *pH de la disolución*: este parámetro es importante cuando los solutos a extraer presentan diferentes características en forma ácida y en forma básica. Estas características modificarán el proceso de extracción, es decir, las condiciones óptimas en las que debe llevarse a cabo el proceso serán diferentes para cada una de las formas. Debido a esto, el pH de la disolución deberá mantenerse dentro del rango que nos permita extraer los compuestos de la forma más eficaz y en la forma que más nos interese [97].
- c) *Efecto de la concentración de surfactante*: la variación de la concentración de surfactante nos permite obtener mayores o menores factores de preconcentración (a mayor concentración de surfactante obtenemos mayores volúmenes de fase rica en surfactante, con lo que el factor de preconcentración disminuye). El factor de preconcentración es un parámetro importante en el proceso, porque por un lado, es el parámetro que determina el volumen final de muestra que se obtiene, y por otro, es con este volumen con el que se realizarán los estudios posteriores. Además, es importante resaltar que éste es el factor que nos condiciona el grado de concentración inicial de analito que se puede determinar en la muestra. Por tanto, debemos elegir una concentración tal que nos permita obtener un factor de preconcentración alto (menor será la concentración inicial con la que podemos trabajar), pero teniendo en cuenta que el volumen extraído debe permitirnos facilidades a la hora de realizar

las manipulaciones posteriores (incidencia sobre la reproducibilidad y precisión del método).

- d) *Efecto de la concentración de analito*: la presencia de diferentes concentraciones de analito en disolución puede producir variaciones en las interacciones con las micelas de surfactante, lo que puede repercutir en la eficacia del proceso. Hemos mencionado con anterioridad que los analitos pueden unirse a las micelas en diferentes puntos, y puede ocurrir que las altas, o bajas, concentraciones de soluto puedan alterar o generar interferencias en los procesos de unión. Es por tanto, un factor a tener en cuenta para los diferentes analitos que se quieran extraer mediante la metodología de “punto de nube”.

Las ventajas que presenta esta metodología frente a las metodologías convencionales pueden resumirse en:

- 1) La selectividad de los surfactantes: los medios micelares son muy selectivos en cuanto a los analitos que concentran en el interior de las micelas.
- 2) Se obtienen altos factores de preconcentración: los reducidos volúmenes de fase rica en surfactante que se extraen permiten obtener un elevado factor de preconcentración de los analitos.
- 3) Seguridad en el trabajo y beneficios de coste (solo es necesario un volumen pequeño de surfactante frente a los grandes volúmenes de disolventes orgánicos utilizados en las metodologías convencionales).
- 4) La fase rica en surfactante que se obtiene tras el proceso es compatible con la fase móvil utilizada en cromatografía líquida tanto micelar como convencional.
- 5) Permite un aumento en la detección del analito en la fase rica en

surfactante frente a la del mismo en fase acuosa [110].

La metodología de extracción por “punto de nube” se aplica para la extracción y preconcentración de gran variedad de compuestos, como por ejemplo: metales [90], hidrocarburos aromáticos policíclicos [91,111], pesticidas organofosforados [112], etc., que se hallan presentes en diversos medios (muestras de agua, sedimentos, suelos, tejidos de organismos, etc.)

5.- Extracción mediante Microondas

La técnica de extracción por “punto de nube”, así como el fenómeno general de separación de fases, es aplicable a muestras líquidas, es decir, a disoluciones, tanto acuosas como de otros disolventes. Pero el problema se plantea a la hora de extraer y preconcentrar compuestos que están presentes en muestras sólidas.

Cuando se quieren analizar compuestos presentes en muestras sólidas, también pueden aplicarse diferentes técnicas que utilicen medios micelares como extractantes y preconcentrantes. Pero en estos casos, el proceso que debe seguirse es diferente. En muestras de sedimento, o muestras sólidas en general, al igual que en muestras en estado líquido, la presencia de surfactantes en la disolución acuosa que se utiliza para la extracción, facilita la movilidad de los compuestos desde el sedimento hasta la fase líquida, puesto que aumentan la solubilidad de los analitos que se desean determinar.

Cuando se utilizan medios micelares para la extracción y preconcentración de analitos presentes en muestras sólidas, es necesaria la realización una serie de pasos previos, los cuales consisten en diferentes lavados de la muestra. Estos lavados permiten a los compuestos adsorbidos en las partículas de sedimento pasar al medio líquido y así, poder ser extraídos posteriormente [113-115]. Todo este proceso de lavado conlleva la necesidad

de utilizar un mayor volumen de disolución acuosa que contiene surfactante, con lo que nos encontramos trabajando con volúmenes que no difieren en gran medida de los necesarios al utilizar la técnica convencional de extracción con disolventes orgánicos. Pero además, hay que añadir un incremento del tiempo necesario para realizar todo el proceso: preconcentración, extracción y determinación.

En la actualidad existen una serie de técnicas alternativas, como son la extracción mediante Soxhlet, ultrafiltración micelar, extracción mediante fluidos supercríticos, extracción por microondas, etc. La técnica de extracción por medio de microondas está siendo cada vez más utilizada, siendo su campo de aplicación extenso. Algunos ejemplos de los procesos que mayormente se llevan a cabo mediante el sistema de microondas son: la obtención de digestiones rápidas, secado de muestras y reducción de las mismas a cenizas.

Esta técnica de extracción con microondas consiste en someter a la muestra, junto con el medio extractante, a un cambio muy rápido e intenso de las condiciones en las que se encuentra inicialmente. Este cambio facilita en gran medida las interacciones soluto-extractante, que tiene como consecuencia una mayor eficiencia de extracción por parte del extractante. Las ventajas que pueden asociarse a esta técnica frente a las técnicas convencionales utilizadas para la extracción de analitos presentes en muestras sólidas, son, principalmente:

- 1) Comodidad y rapidez en cuanto al análisis: se requiere un periodo de tiempo relativamente corto para la realización de la extracción, el cual puede variar de unos compuestos a otros, pero siempre en un rango entre varios segundos y media hora.
- 2) Reducción del volumen de disolvente (extractante) utilizado en la extracción de los analitos [116,117].

Siempre que se trabaja con una nueva técnica, es necesario conocer y

optimizar aquellos parámetros que tienen, o pueden tener, influencia en el proceso. Cuando el extractante es un disolvente orgánico convencional, como por ejemplo hexano, existen diferentes parámetros que pueden afectar al proceso de extracción, como son: la temperatura a la que tiene lugar la extracción, el tiempo de extracción y el volumen de extractante.

La metodología de extracción por microondas puede aplicarse a la determinación de diferentes compuestos presentes en muestras sólidas, como por ejemplo pesticidas, hidrocarburos aromáticos, metales, etc. [116-123]

Esta metodología es bastante reciente, habiendo muy pocos estudios referente a la misma, y en cuanto a estudios donde se aplica conjuntamente con los medios micelares las investigaciones son aún más escasas. La finalidad de aplicar estas dos metodologías radica en el interés que se tiene siempre en la reducción del tiempo de análisis y en facilitar lo máximo posible el mismo (técnica de microondas), y de reducir la toxicidad del medio extractante. Cuando se trabaja con medios micelares como extractantes, deben tenerse en cuenta los mismos parámetros que se estudian en la técnica convencional, pero teniendo presente algunas consideraciones más. Estos parámetros son:

a) *La temperatura a la que se lleve a cabo la extracción:* podemos tener variaciones en la eficiencia de extracción en función de si se trabaja por encima o debajo de la temperatura de “punto de nube” a partir de la cual se produce la separación de fases. Se debe comprobar si la separación de fases que tiene lugar al trabajar por encima de esta temperatura va a tener influencia o no en la desorción de los analitos y sus interacciones con las micelas, lo que afectará a la eficiencia del proceso de extracción. A la hora de establecer este parámetro también se debe tener presente la volatilidad de los analitos con los que se está trabajando, puesto que para no tener pérdidas de los mismos se tendrá que utilizar una temperatura inferior a aquella que produce esta volatilización.

b) *pH*: este parámetro, puede afectar a la forma en que se presentan los analitos, y puede tener también influencia sobre las interacciones establecidas entre el sedimento y el analito y que controlan la adsorción-desorción de los mismos.

c) *El número de lavados que se realizan*: tanto el volumen o concentración de surfactante que se añada para la extracción, como el número de veces que se realice el proceso de extracción, pueden afectar en mayor o menor medida a la eficiencia del mismo.

d) *El tiempo de extracción*: influirá en los equilibrios, y será un factor importante puesto que la muestra estará sometida al proceso en mayor o menor grado.

En esta Tesis se combinará la metodología de extracción con microondas y los medios micelares como extractantes, aplicándolos a la determinación de PCBs y PCDFs presentes en sedimentos y organismos marinos.

6.- Objetivos del Trabajo

En la realización de este trabajo se han planteado los siguientes objetivos:

- ❖ Caracterización de los distintos surfactantes no iónicos que van a ser utilizados en los diversos estudios que se llevarán a cabo a lo largo del presente trabajo. Estos surfactantes son:
 - Oligoetilen Glicol Monoalquil eter (Genapol X-080)
 - Polioxietilen 4 lauril eter (Brij 30)
 - Polioxietilen 23 lauril eter (Brij 35)
 - Polioxietilen 10 cetil eter (Brij 56)
 - Polioxietilen 10 estearil eter (Brij 76)
 - Polioxietilen 10 oleil eter (Brij 97)
 - Polioxietilen 10 lauril eter (POLE)
- ❖ Estudio de las características espectrofluorimétricas de los PCBs y los PCDFs en estudio, en los diferentes medios micelares.
- ❖ Establecimiento de las condiciones de separación adecuadas utilizando la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (para familias individuales o mezclas de las mismas).
- ❖ Optimización de la metodología de extracción por punto de nube para muestras de agua de mar que contienen PCBs y PCDFs.
- ❖ Puesta a punto de la metodología de extracción por microondas y medios micelares para la determinación de PCBs y PCDFs en muestras de sedimentos y organismos marinos (tanto por separado como en mezclas).
- ❖ Aplicación de las metodologías anteriores a muestras reales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Caracterización de los Surfactantes

Los sistemas moleculares organizados, más conocidos como “*medios micelares*”, “*surfactantes*” o “*tensoactivos*”, son sustancias que presentan en su estructura molecular dos grupos con carácter diferente. El grupo no polar, denominado “*cola*”, es generalmente una cadena hidrocarbonada, mientras que el grupo polar, llamado “*cabeza*”, es un grupo altamente hidrofóbico (Figura 3). Debido a esta estructura, denominada “anfipática”, los surfactantes tienden a concentrarse en la superficie del agua, reduciendo la tensión superficial del mismo, y pudiendo adsorberse en las diferentes superficies o interfases de un sistema.

Además de estas propiedades, los tensoactivos pueden formar agregados denominados “*micelas*”. Estas micelas (Figura 4) se forman cuando la concentración de surfactante en disolución supera un valor mínimo, denominado *concentración micelar crítica* (c.m.c.). Las micelas tienen como principal característica la de incrementar la solubilidad de diferentes compuestos en medios no polares. Esto se consigue mediante la unión que se establece entre los diversos solutos presentes en el medio y las micelas. También hay que mencionar la intervención de los surfactantes en otros procesos, como son: la alteración de los parámetros físico-químicos de iones y moléculas, procesos de radiación UV-visible, aumento de la intensidad de fluorescencia, etc.

Por tanto, las características presentadas por los medios micelares, hacen que estos sistemas moleculares organizados sean ampliamente utilizados en diferentes procesos de separación. Principalmente se puede hablar de procesos de extracción de compuestos, como por ejemplo proteínas [85], metales [86], compuestos bioquímicos [88], etc, de separaciones

cromatográficas, por ejemplo de capa fina [92], filtración con gel [94], y separaciones por ultrafiltración o mediante membranas líquidas [66,96].

A la hora de clasificar los surfactantes, se hace uso de la naturaleza del grupo hidrofílico. De esta manera, aparecen cuatro grupos: catiónicos (carga positiva), aniónicos (carga negativa), zwitteriónicos (un grupo con carga positiva y otra negativa) y no iónicos (no poseen grupos con carga).

Los surfactantes que se han utilizado en los diferentes estudios realizados a lo largo del desarrollo de la presente Tesis, son surfactantes de carácter no iónico, que pertenecen principalmente a la familia de los denominados surfactantes polioxietilénicos. El nombre, la fórmula, junto a algunas de las características invariables de estos surfactantes, se muestran en la Tabla VII.

Tabla VII.- Surfactantes utilizados

Surfactante	Fórmula	A#	P.M. ξ	ρ^Ψ (g/ml)
Oligoetilen Glicol Monoalquil eter	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{-O}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_8\text{-H}$	Genapol X-080	552.0	0.99
Polioxietilene 4 lauril eter	C_{12}E_4	Brij 30	362.0	0.95
Polioxietilen 23 lauril eter	$\text{C}_{12}\text{E}_{23}$	Brij 35	1199.6	-----*
Polioxietilen 10 cetil eter	$\text{C}_{26}\text{E}_{10}$	Brij 56	682.0	1.00
Polioxietilen 10 estearil eter	$\text{C}_{18}\text{E}_{10}$	Brij 76	710.0	1.05
Polioxietilen 10 oleil eter	$\text{C}_{18-1}\text{E}_{10}$	Brij 97	708.0	1.00
Polioxietilen 10 lauril eter	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_{23}\text{OH}$	POLE	626	0.93

A#: Abreviatura; * Se encuentra en estado sólido;

ξ : Peso Molecular; Ψ : densidad

La representación estructural de la molécula de surfactante es muy compleja, independientemente de la naturaleza de los diferentes grupos que la componen, de ahí que se tienda a representarlos de forma simplificada. Algunos ejemplos se muestran en la Figura 8.

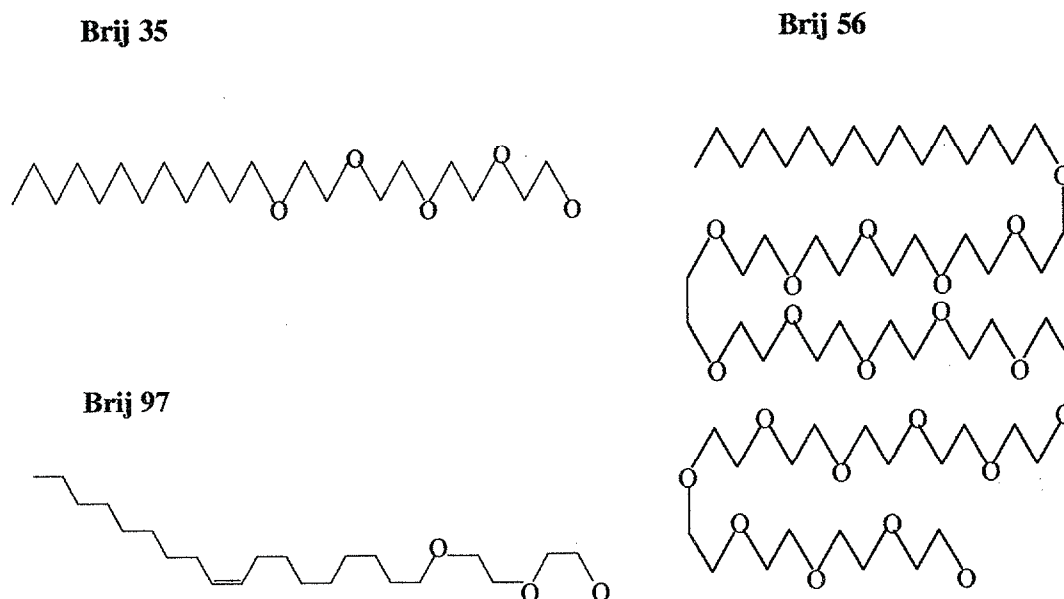


Figura 8.- Representación de algunas moléculas de surfactante.

A la hora de utilizar los surfactantes como medios para la separación deben tenerse en cuenta aquellos parámetros que van a determinar, o controlar la separación. En aquellos casos donde se trabaja mediante separaciones de fase, los sustratos o complejos insolubles, presentes en el medio acuoso, se extraen del mismo en una fase de menor volumen formada en su mayoría por surfactante. En función del tipo de surfactante, las propiedades que deben modificarse para que se produzca la separación de las fases es diferente.

Cuando se modifican las condiciones de un medio, hay que tener muy presente, que las características que presentan los medios micelares varían dependiendo de las condiciones experimentales. Por tanto, y debido a estas variaciones, se hace necesaria la determinación de los diferentes parámetros que controlan, o caracterizan el proceso, para cada caso particular. Estos parámetros son principalmente, la concentración micelar crítica de cada surfactante, y la temperatura crítica a la cual se produce la separación de fases, que se obtendrá a partir del diagrama de fases. Cuando se trabaja con surfactantes de carácter no iónico, la separación de fases se consigue mediante una variación de la temperatura a la que se encuentra la disolución. En estos casos, el diagrama de fases mostrará la temperatura crítica del proceso. La determinación de los diferentes parámetros, se realizará mediante la utilización de técnicas específicas para cada uno de los mismos.

1.1.- Concentración micelar crítica

Los surfactantes tienen la capacidad de formar agregados denominados micelas, de ahí que también reciban el nombre de medios micelares. Pero la formación de micelas no ocurre siempre. Cuando la concentración de surfactante en disolución es baja, las moléculas aparecen formando monómeros. A medida que la concentración aumenta, el número de monómeros es mayor, llegando a un punto en el que la concentración es elevada y éstos se agrupan para formar las micelas. De esta forma se tiende a alcanzar el estado de mínima energía libre.

A la concentración de surfactante en disolución, a partir de la cual se forman los agregados micelares, se le denomina “*concentración micelar crítica*” y su determinación es importante a la hora de caracterizar la disolución de surfactante que se va a utilizar. Esta característica, propia de cada surfactante en disolución, y altamente dependiente de las condiciones y

rísticas del medio, puede determinarse mediante la utilización de diferentes técnicas fisico-químicas.

Entre ellas podemos destacar la conductimetría, tensiometría, fluorimetría, calorimetría, resonancia magnética nuclear, espectrofotometría, viscosimetría, visible-UV, etc., siendo las más utilizadas las tres primeras. Si comparamos los valores de concentración micelar crítica obtenidos por los diferentes métodos fisico-químicos, observamos que los valores difieren unos de otros aunque sea en pequeña cantidad [62,64,68]. Es normal encontrarse con estas pequeñas variaciones en el valor de la concentración micelar crítica, puesto que ésta dependerá principalmente de la precisión de la técnica utilizada, así como de la propiedad física que se mida.

Como se ha mencionado previamente, la formación de micelas produce alteraciones en las propiedades del medio, y por tanto, estas variaciones deben ser observadas en la medición de las mismas. Estas variaciones pueden corresponderse con saltos en los valores medidos, o a cambios de pendiente, que son los que nos indican el intervalo en el que se encuentra la concentración micelar que se desea conocer.

El tipo de gráficas que podemos encontrarnos al utilizar una u otra técnica, así como las variaciones típicas que se pueden observar en las mediciones se muestran en la Figura 9. En esta figura se pueden observar los diferentes puntos de inflexión que aparecen a lo largo de la medición de las diferentes propiedades, y que son considerados como indicadores del momento o concentración de surfactante en la que se forman los agregados micelares.

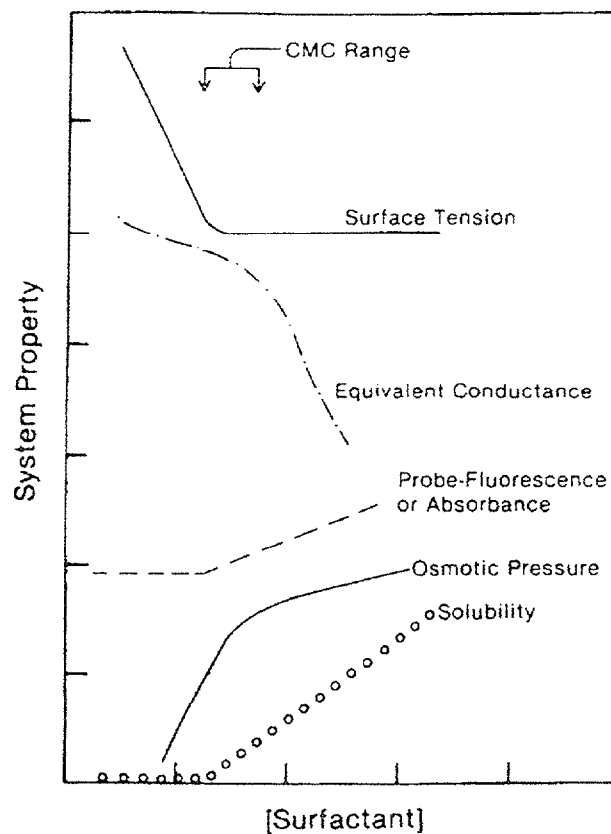


Figura 9.- Variaciones típicas en las propiedades de sistemas agua-surfactante [68].

La técnica seleccionada en este estudio para el cálculo de las concentraciones micelares críticas de los diferentes surfactantes estudiados, ha sido la conductimetría. Para ello, se ha medido la conductividad de varias disoluciones con diferentes concentraciones de surfactante. El valor de la concentración micelar crítica se ha calculado mediante la representación gráfica de la conductividad de la disolución frente a la concentración de surfactante en la disolución. Algunos ejemplos representativos de los diferentes surfactantes utilizados en este trabajo, se muestran en la Figura 10.

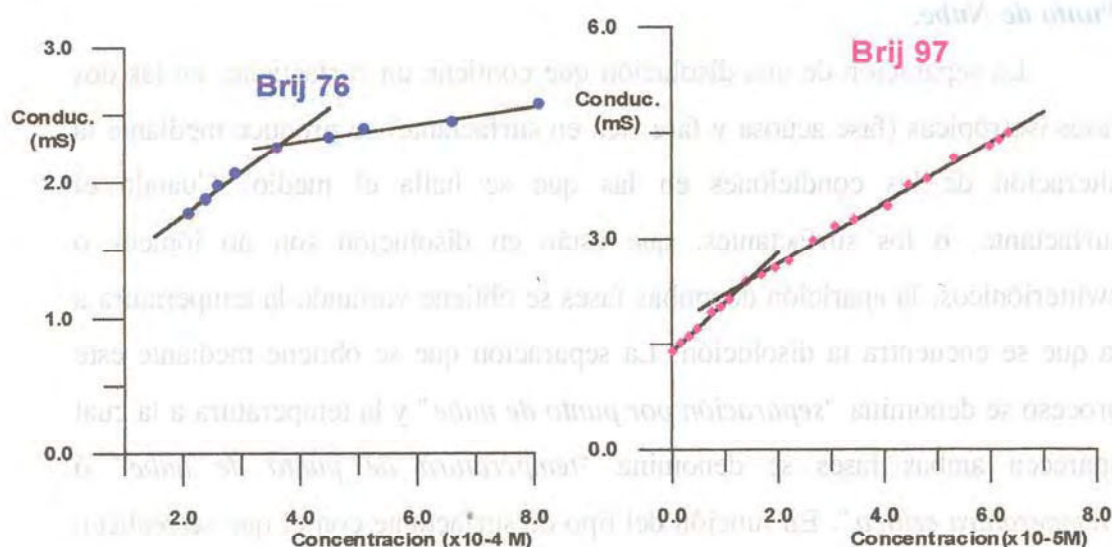


Figura 10.- Cálculo de la concentración micelar crítica por conductimetría.

Como se puede observar en la figura, existe una variación de la pendiente en la representación de las medidas de conductividad. Teniendo en cuenta estos datos, y trazando ambas rectas de regresión correspondientes a cada tramo, obtenemos la concentración micelar crítica del surfactante, la cual vendrá dada por el punto de intersección de ambas rectas [124]. Se debe tener presente que la concentración micelar crítica obtenida se utiliza como valor de referencia, trabajándose siempre a concentraciones mínimas 2 o 3 veces superiores a la calculada. De esta forma, se tendrá la certeza de trabajar siempre con sistemas en los que existen o están presentes los agregados micelares.

Los valores de la concentración micelar crítica, calculados para los diferentes surfactantes mediante esta técnica se muestran en la Tabla VIII.

1.2.- Cálculo de la temperatura crítica a la que se produce el proceso de Punto de Nube.

La separación de una disolución que contiene un surfactante, en las dos fases isotrópicas (fase acuosa y fase rica en surfactante) se produce mediante la alteración de las condiciones en las que se halla el medio. Cuando el surfactante, o los surfactantes, que están en disolución son no iónicos o zwitteriónicos, la aparición de ambas fases se obtiene variando la temperatura a la que se encuentra la disolución. La separación que se obtiene mediante este proceso se denomina *“separación por punto de nube”* y la temperatura a la cual aparecen ambas fases se denomina *“temperatura de punto de nube”* ó *“temperatura crítica”*. En función del tipo de surfactante con el que se realicen las investigaciones, se pueden encontrar dos situaciones diferentes: que la temperatura a la cual se produce el proceso sea superior a la temperatura ambiente, o sea inferior.

Como se ha mencionado previamente, los surfactantes que se utilizan en este trabajo de investigación son surfactantes polioxietilénicos, y se caracterizan por presentar temperaturas críticas superiores a la temperatura ambiente. Por tanto, para producir la separación se deberá incrementar la temperatura a la que se encuentra la disolución. El efecto de la temperatura sobre una disolución que contiene un medio micelar, se contempla al representar gráficamente la temperatura que debe alcanzarse para observar la aparición de las dos fases frente a la concentración de surfactante en la disolución. Estas gráficas se denominan *“diagramas de fases”* e indican la zona en la que está presente una única fase, y la zona donde coexisten ambas fases.

Para la obtención de los diagramas de fases se han preparado diferentes disoluciones conteniendo cada una de ellas, una concentración de surfactante conocida que varía en un intervalo comprendido entre 0.05-5% (p/v), y sometiénolas posteriormente a un incremento de temperatura progresivo, de 5° C, la cual se mantenía durante 10 min. (tiempo suficiente para que se

estabilice la disolución y se observe la separación). Las variaciones en la temperatura se realizaron manteniendo las disoluciones en el interior de un baño termostatzado, y estando las mismas en tubos cerrados. La temperatura a la cual se produce la separación de las fases se considera como aquella en la que la disolución presenta un enturbiamiento y se observa la presencia de ambas fases. Cuando la concentración de surfactante en disolución es pequeña, no se observa la aparición de una fase rica en surfactante homogénea, sino que el surfactante se agrupa formando pequeñas gotas. Esto es debido a que la cantidad de surfactante en disolución es insuficiente como para que se forme una fase completa. A medida que la concentración aumenta, se observa la aparición de una fase rica en surfactante más homogénea, hasta alcanzar un punto en el cual la separación es completa y bien diferenciada.

Los diagramas de fases de algunos de los surfactantes en estudio, obtenidos de representar la temperatura de enturbiamiento frente a la concentración de surfactante en disolución, se muestran en la Figura 11. Hay que reseñar que todos los surfactantes estudiados presentan el mismo comportamiento al observado en otros estudios realizados anteriormente [101,125].

La curva dada por el diagrama de fases, nos indica aquellas temperaturas a las cuales se obtiene la aparición de ambas fases isotrópicas, y aquellas para las cuales solo hay una fase. La zona situada por debajo de la curva es aquella en la no existe la separación, mientras que la zona que se encuentra por encima de la curva, es en la cual coexisten ambas fases.

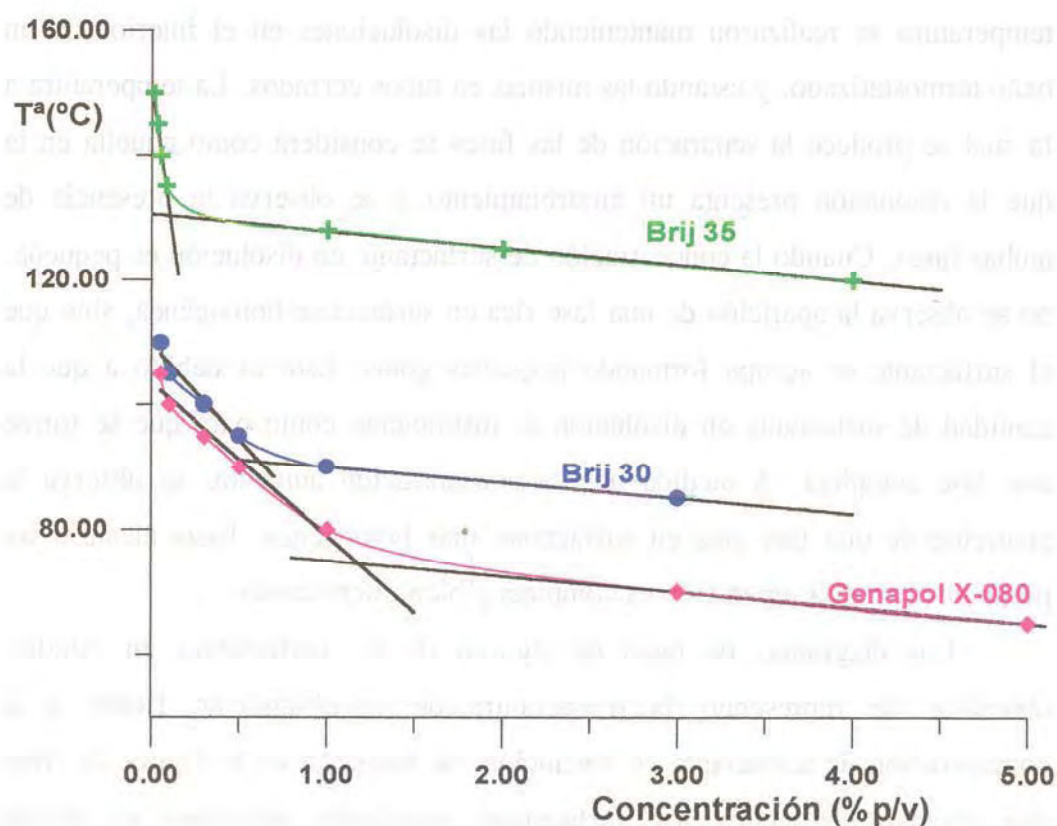


Figura 11.- Diagramas de fases de tres surfactantes no iónicos

Como se puede observar, la curva se caracteriza por presentar dos zonas diferenciadas que vienen caracterizadas por dos rectas de pendiente diferente. En estas gráficas, la temperatura crítica por encima de la cual se debe trabajar para obtener la separación de las fases, es calculada a partir del punto de corte de dichas rectas [89]. Las temperaturas críticas resultantes de realizar el diagrama de fases para los diferentes surfactantes en estudio se muestran en la Tabla VIII.

Tabla VIII.- Características calculadas para los surfactantes utilizados.

Surfactante	c.m.c. [#]	T ^a (°C)*
Genapol X-080	5.0×10^{-5}	75±5
Brij 30	6.4×10^{-5}	85±5
Brij 35	1.7×10^{-4}	125±5
Brij 56	6.7×10^{-7}	80±5
Brij 76	3.5×10^{-4}	80±5
Brij 97	1.7×10^{-6}	85±5
POLE	6.4×10^{-5}	90±5

Concentración micelar crítica; * Temperatura crítica

2.- Optimización del proceso de separación de fases en la metodología de extracción por Punto de Nube:

Es bien conocida la existencia de diversos factores que influyen en el proceso de separación de fases propiamente dicho. Estos factores actúan variando la concentración micelar crítica del surfactante en disolución y por tanto tendrán un efecto notable en el proceso de separación. Las condiciones de trabajo para que se produzca la separación de fases por “*punto de nube*” se establecen en base a la concentraciones críticas y temperaturas establecidas. Por tanto, si a la disolución acuosa de surfactante se le alteran las condiciones, bien por adición de diferentes analitos o por variación de otros factores, se deberá estudiar el efecto de las mismas en el proceso de separación.

Paralelamente al estudio llevado a cabo para la determinación de la temperatura crítica, se ha estudiado la relación existente entre el volumen extraído de fase rica en surfactante tras el proceso (V_s), y el volumen de la fase acuosa (V_{ac}). La relación que se obtiene indica el grado, o factor en el que se preconcentrará el analito presente en la muestra a analizar. Por esto, a esta relación se la conoce como “*factor de preconcentración*”. Los factores de preconcentración obtenidos mediante esta técnica son elevados, puesto que el volumen de la fase rica en surfactante que se extrae tras la separación es reducido [98,126,127]. El volumen de fase rica extraído dependerá de la cantidad de surfactante en disolución, es decir, de la concentración del mismo. Debido al reducido volumen de la fase rica en surfactante, siendo ésta la que interesa, es necesario establecer un volumen de la misma suficientemente alto como para que su manipulación no conlleve problemas y los resultados sean reproducibles. Por tanto es necesario optimizar dicho volumen manteniendo al mismo tiempo un factor de preconcentración aceptable. Por otra parte el establecimiento de un factor de preconcentración nos condicionará la concentración inicial de analito que debe estar presente en la muestra original

para poder ser determinado. De esta forma, el factor de preconcentración que se deba utilizar, dependerá en gran medida de la concentración inicial de analito que se quiera determinar.

Los principales factores que van a afectar al volumen de fase rica en surfactante extraído tras el proceso de separación son: la concentración final de surfactante en disolución, el volumen de surfactante añadido y la fuerza iónica del medio.

2.1.- Variación de la concentración de surfactante en disolución

La cantidad de surfactante en disolución es un parámetro que determina claramente el volumen de fase rica en surfactante que se extrae, y su determinación dependerá de la cantidad mínima de fase que se requiera para la realización de los análisis posteriores [89,110].

Para el estudio del efecto producido por este parámetro, disoluciones con diferente concentración de surfactante en un intervalo entre 0.05-5% (p/v), habiéndose añadido a todas un volumen constante de 5 ml. de disolución patrón y enrasándose con agua hasta alcanzar los 10 ml., se sometieron al proceso de separación de fases.

Una vez separadas las dos fases, las muestras se centrifugan durante 5 min. a 3500 r.p.m. El proceso de centrifugación, se realiza para facilitar la separación de las fases y su posterior extracción. Para mantener las dos fases que se han obtenido en el proceso de punto de nube, y teniendo presente que las mismas se mezclan nuevamente para formar una sola fase cuando la temperatura disminuye por debajo de la temperatura crítica, los portatubos de la centrifuga se mantienen calientes. De esta forma se evita la reversibilidad del proceso.

Para calcular el factor de preconcentración hallamos la relación (V_{ac}/V_s) para los volúmenes obtenidos tras el proceso de punto de nube. Los resultados se muestran en la Tabla IX.

Los resultados obtenidos indican una clara disminución en la relación entre los volúmenes, es decir, en el factor de preconcentración, al aumentar la concentración de surfactante en disolución. Esta disminución es bastante pronunciada hasta un valor aproximado de concentración de surfactante al 1% (p/v) a partir del cual esta variación se hace más suave, pudiendo considerarse prácticamente constante para el caso del Genapol X-080, Brij 56 y Brij 97. Este comportamiento está en concordancia con los resultados obtenidos en otros estudios [4,126,128] en los que se hace referencia al efecto de la concentración de surfactante en disolución.

Al igual que se establece la temperatura crítica por encima de la cual se debe mantener la disolución para obtener la separación en las dos fases isotrópicas, también es necesario establecer la concentración óptima de surfactante en disolución. Como se ha comprobado el efecto de la concentración de surfactante en disolución sobre la relación de volúmenes entre la fase rica en surfactante y la fase acuosa, y teniendo en cuenta la necesidad de un volumen de fase rica en surfactante que permita un adecuado manejo de la misma, la concentración de trabajo se ha establecido en el 2% (p/v). Los volúmenes que se obtienen para esta concentración son adecuados, y permiten además la obtención de un factor de preconcentración adecuado.

Tabla IX.- Relación de volúmenes (V_{ac}/V_s) para los diversos surfactantes.

Concen.Surf. % (p/v)	Genapol X-080	Brij 30	Brij 35	Brij 56	Brij 76	Brij 97	POLE
0.05	50.0	*	*	33.0	*	65.7	*
0.10	20.0	*	*	16.0	99.0	49.0	*
0.30	12.5	99.0	99.0	11.1	49.0	27.6	*
0.50	10.0	65.7	49.0	10.0	32.3	24.0	49.0
1.00	10.0	39.0	32.3	8.2	19.0	9.0	21.2
3.00	8.2	32.3	24.0	8.2	8.0	8.1	11.5
5.00	7.8	#	19.0	7.6	#	7.4	8.1

* El volumen de fase rica en surfactante era demasiado pequeña para poder medirse.

La disolución obtenida no es completamente homogénea para esta concentración.

2.2.- Variación del volumen de surfactante añadido a la disolución

Otro factor que puede tener influencia sobre el proceso de separación, y por tanto, sobre la relación entre los volúmenes extraídos, es el volumen de disolución patrón de surfactante añadido a la muestra. Para el estudio de este parámetro se prepararon diferentes disoluciones a las que se añadía diferente volumen de surfactante, manteniendo fija la concentración final de este en las mismas. La concentración final de surfactante se estableció en 2% (p/v), valor obtenido a partir del estudio anterior.

El volumen añadido a la disolución se varió dentro del intervalo de 1.0-8.0 ml., pero manteniendo constante el volumen total de la disolución en 10 ml. Los resultados obtenidos para los diferentes surfactantes tras el proceso de separación por punto de nube, y centrifugación durante 5 min., se muestran en la Tabla X.

Tabla X.- Relación de volúmenes (V_{ac}/V_s) obtenidos con la variación del volumen de surfactante añadido.

V. Añad. (ml)	Surfactante						
	Genapol X-080	Brij 30	Brij 35	Brij 56	Brij 76	Brij 97	POLE
2.0	9.0	10.1	15.7	10.1	7.3	10.1	15.7
4.0	9.0	13.3	15.7	9.0	15.7	13.3	16.1
6.0	9.0	19.0	21.2	11.5	13.3	19.0	16.3
8.0	10.1	32.3	32.3	9.0	10.1	49.0	15.8

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se observan dos tipos de comportamiento diferenciados para los distintos surfactante. Uno, en el cual la variación del volumen añadido no es un factor importante, es decir, la relación entre volúmenes se mantiene prácticamente constante y por tanto el volumen final de fase rica en surfactante no se ve alterada por el volumen añadido, caso del Genapol X-080, Brij 56 y POLE; y un segundo comportamiento en el cual se observa una variación lineal de la misma, bien una disminución, caso del Brij 76, o bien un incremento para los restantes.

Una forma más clara de ilustrar estos comportamientos es la representación gráfica de los valores obtenidos para cada caso. Un ejemplo del resultado que se obtiene de este estudio se muestra en la Figura 12, donde se representa el volumen extraído frente al volumen de surfactante añadido.

Como la finalidad de los estudios realizados es la optimización del proceso, teniendo presente las dificultades que se plantean con el volumen reducido de fase rica en surfactante, y observando los resultados, se ha decidido fijar el volumen de surfactante a añadir en 4 ml. como el más adecuado a la hora de preparar las disoluciones que posteriormente serán objeto del proceso de separación por punto de nube.

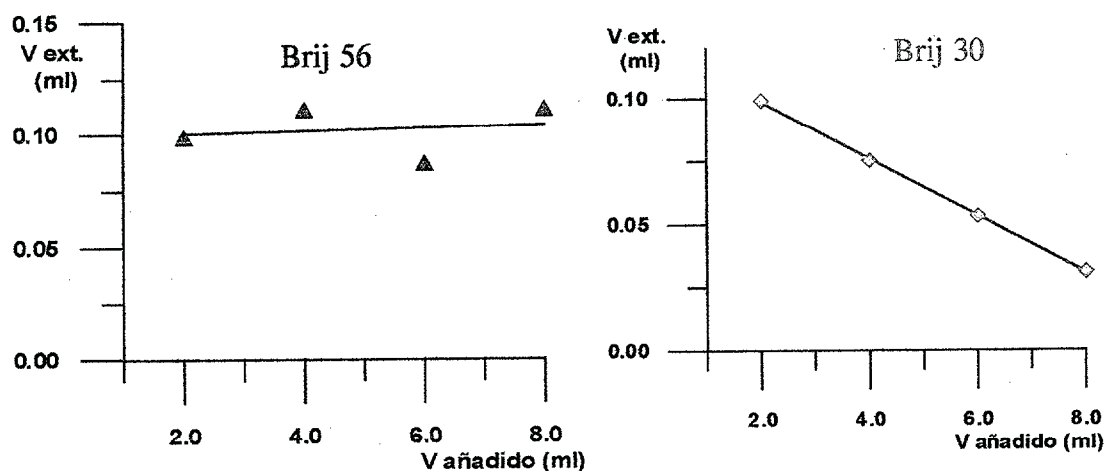


Figura 12.- Volumen de fase rica en surfactante extraído frente al volumen de surfactante añadido.

2.3.- Fuerza iónica del medio

Es sabido que la fuerza iónica del medio produce variaciones en los coeficientes de actividad puesto que éstos presentan una relación logarítmica de tipo lineal con la misma. Por tanto, este factor puede afectar a la solubilidad del surfactante, y en consecuencia a la separación de fases [105]. Por otro lado, la adición de sales produce una disminución en la temperatura del proceso de punto de nube [103,104,129]. Pero el efecto de la adición de sales a la disolución sobre el volumen de fase rica en surfactante extraído, no está muy bien establecido. Algunos autores han observado que la adición de electrolitos a concentraciones inferiores a 0.01 M no producen variaciones significativas en el proceso de extracción por punto de nube [130,131], mientras que algunos otros indican una concentración de 0.1 M como aquella a partir de la cual aparecen efectos apreciables [105,131]. Pero cabe citar trabajos en los que se

ha observado que la adición de electrolitos no siempre afecta al volumen extraído, independientemente de la concentración de los mismos [103,104].

Para determinar el efecto de este parámetro en las condiciones de trabajo utilizadas en esta Tesis, se ensayaron diferentes concentraciones de KNO_3 en la disolución. El intervalo de concentraciones de estudio comprendió valores del 1 al 10% (p/v), que corresponden a concentraciones superiores a 0.1 M, puesto que se ha considerado que para concentraciones inferiores a ésta no se observan efectos notables.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XI y Figura 13.

Tabla XI.- Volumen de fase rica en surfactante extraída tras la adición de KNO_3 .

KNO_3	Surfactante						
	Genapol X-080	Brij 30	Brij 35	Brij 56	Brij 76	Brij 97	POLE
1%	0.7	0.2	0.1	1.0	0.7	0.8	0.6
3%	0.9	0.2	0.1	0.7	0.7	0.8	0.6
5%	0.7	0.3	0.2	0.4	0.7	0.8	0.5
7%	0.8	0.2	*	0.3	0.6	0.8	0.6
10%	1.0	0.1	*	0.2	0.6	0.7	0.5

* No se pudo medir correctamente debido al poco volumen de fase rica en surfactante

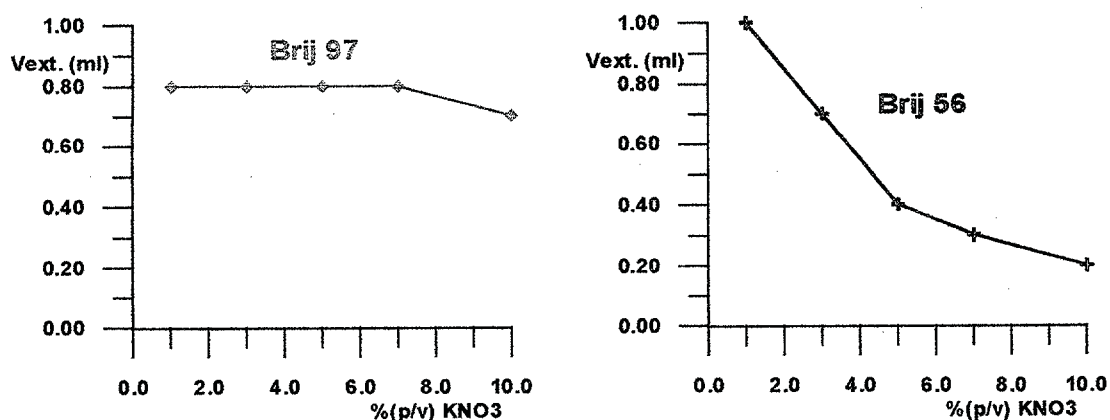


Figura 13.- Volumen de fase rica en surfactante frente a concentración de KNO₃.

El volumen de fase rica en surfactante extraído es independiente de la adición de KNO₃, salvo para el caso del Brij 56, el cual presenta una disminución del volumen extraído al aumentar la concentración de sal añadida.

Por otro lado, cabe reseñar que la adición de la sal facilita la extracción de la fase rica en surfactante tras el proceso de separación. Esta observación también se ha podido comprobar en trabajos previos donde se indica que la presencia de sales en disolución aumentan y estabilizan las fuerzas electrostáticas generadas en la superficie de las micelas, con lo que las mismas aparecen a concentraciones más reducidas y aumenta la densidad de la fase acuosa, lo que permite una mejor separación de la fase micelar respecto a la fase acuosa [104].

Teniendo presente estos resultados, podemos indicar que la metodología en estudio puede ser aplicada a diferentes muestras de agua de mar independientemente de la zona de procedencia de las mismas, puesto que es bien conocida la variación de salinidad que existe de unas zonas a otras.

2.4.- Otros factores

Aparte de los descritos anteriormente existen además otros factores que pueden afectar al volumen extraído. Estos factores son principalmente la presión a la que se somete el sistema, y la adición de disolventes orgánicos. En este estudio no se ha tenido en cuenta los efectos que puede producir la variación de presión en el sistema, puesto que las diferentes muestras se han mantenido a presión constante (atmosférica), y por tanto no deberían aparecer variaciones en el volumen de fase rica extraída.

Por otro lado, en referencia a la presencia de disolventes orgánicos, hay que indicar que la proporción y tipo de disolvente orgánico en las disoluciones se ha mantenido siempre constante en un 2% (v/v) de etanol. Todos los estudios se han realizado utilizando este disolvente, ya que las disoluciones iniciales de los analitos a estudiar en la presente Tesis se han preparado en etanol, al presentar los mismos una excelente solubilidad en dicho disolvente orgánico. Por ello no se ha realizado ningún estudio del efecto de otros disolventes orgánicos sobre el volumen de fase rica en surfactante extraído.

3.- Características Espectrofluorimétricas de los PCBs y PCDFs en los diferentes medios micelares

A la hora de la determinación de los diferentes compuestos a analizar se deben optimizar todas aquellas condiciones que permitan mejorar la sensibilidad y selectividad de la técnica y metodología que se utilizan. En este trabajo se aplica la fluorescencia como técnica acoplada a la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia para la determinación de los analitos en estudio (PCBs y PCDFs). Por tanto será necesaria la caracterización de cada uno de los analitos, respecto a esta técnica, para su posterior identificación y cuantificación.

La espectrometría de fluorescencia es una técnica muy útil en análisis cuantitativo por su gran sensibilidad y selectividad, y también por su rapidez y su relativamente bajo coste. Pero debe tenerse en cuenta, que la modificación del entorno en el que se encuentra la sustancia a analizar, puede afectar profundamente a los espectros de fluorescencia.

En el desarrollo de los estudios comprendidos en este trabajo, los diferentes analitos se van a encontrar en diversos medios micelares (fase rica en surfactante). Los sistemas micelares constituyen microentornos que pueden producir modificaciones importantes en los espectros de excitación y emisión de muchas moléculas, así como en la intensidad de fluorescencia emitida, apareciendo aumentos de la sensibilidad, disminución de las interferencias y mayor simplicidad experimental [132-137]. El aumento en la intensidad de fluorescencia puede deberse a:

- Una protección del fluoróforo cuando se encuentra en el interior de la micela, reduciendo el efecto quenching vibracional de la red acuosa.
- Reducción del quenching producido por el oxígeno.
- Alteración de las propiedades fotofísicas del medio.

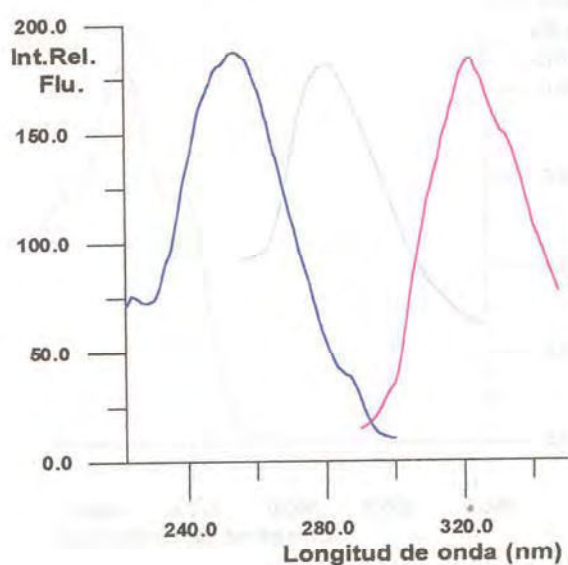
Todos estos factores tienen como resultado una mayor protección del estado singulete excitado por lo que los procesos radiantes compiten con otros procesos de desactivación [132].

Pero el efecto beneficioso de las micelas no es igual para todos los medios, por lo que en cada caso concreto será necesario elegir el medio micelar y las condiciones más adecuadas al sistema con el que se trabaja [133].

En el presente capítulo se pretende establecer la influencia de los diversos sistemas micelares en la fluorescencia de los PCBs y PCDFs en estudio, y que pueden afectar a su posterior determinación. Las condiciones de trabajo se establecieron en:

- una concentración de surfactante en disolución igual a dos veces la concentración micelar crítica, previamente determinada, con lo cual se asegura la presencia de micelas en el medio.
- una concentración de etanol en disolución del 2% (v/v), para asegurar que el analito se encuentra disuelto.

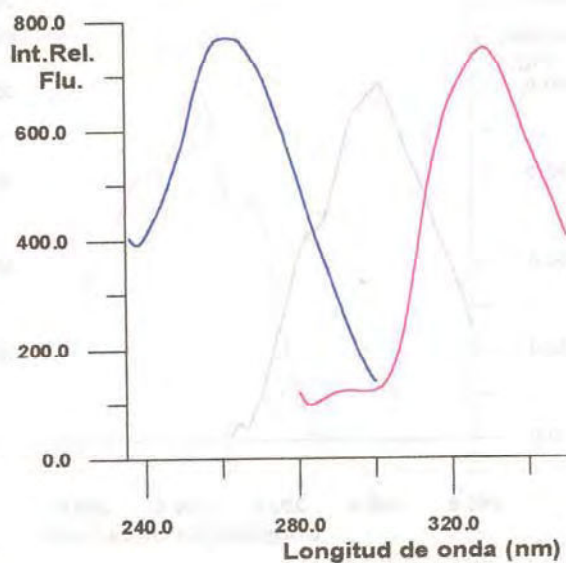
La caracterización fluorescente de los diferentes analitos en estudio se ha llevado a cabo mediante la técnica de espectrofluorimetría convencional, en la cual los espectros de emisión se han realizado excitando los compuestos a una longitud de onda fija, *longitud de onda de excitación* (λ_{ex}), y haciendo un *barrido* de longitudes de onda emitidas (λ_{em}). El espectro de excitación se realiza *barriendo* las longitudes de onda de excitación (λ_{ex}) mientras que la *longitud de onda de emisión* (λ_{em}), permanece fija. Algunos de los espectros, tanto de excitación como de emisión, obtenidos para los PCBs, en las condiciones anteriormente citadas, se muestran en las Figuras 14 y 15.



— Espectro de excitación
— Espectro de emisión

Figura 14.- Espectros de fluorescencia del MBF en Brij 30.

$\lambda_{ex} = 254 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 351 \text{ nm}$

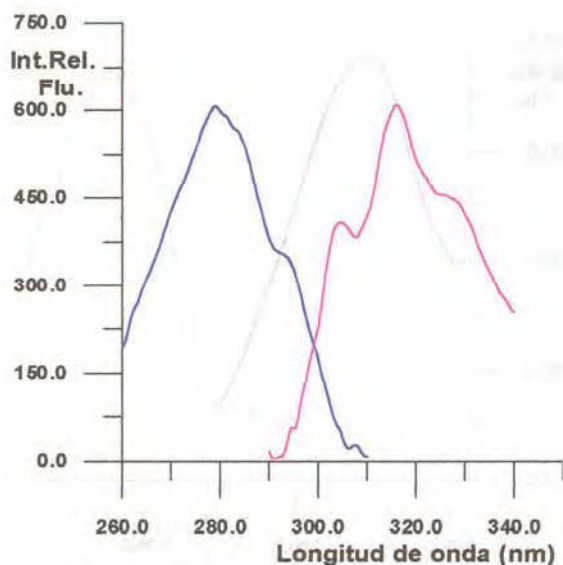


— Espectro de excitación
— Espectro de emisión

Figura 15.- Espectros de fluorescencia del TriBF en POLE.

$\lambda_{ex} = 261 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 328 \text{ nm}$

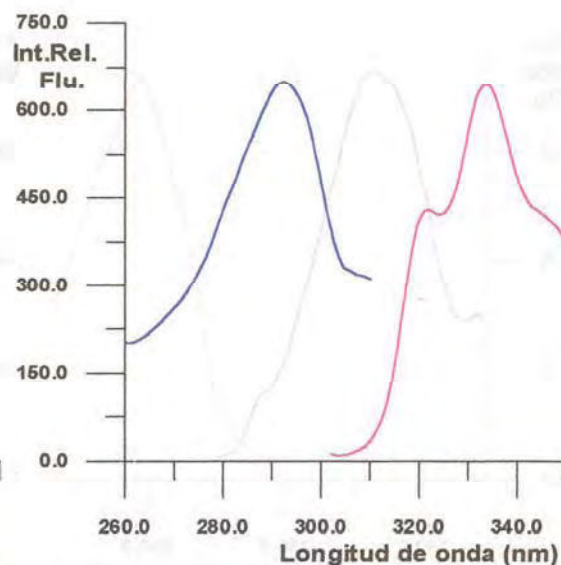
El estudio de los PCDFs se realizó de la misma forma que en el caso anterior, y algunos ejemplos de los espectros obtenidos para los diferentes analitos se muestran en las Figuras 16 y 17.



— Espectro de excitación
— Espectro de emisión

Figura 16.- Espectros de fluorescencia del DBFo en Brij 30.

$\lambda_{ex} = 278 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 316 \text{ nm}$



— Espectro de excitación
— Espectro de emisión

Fig. 17.- Espectros de fluorescencia del DiCDF en POLE.

$\lambda_{ex} = 292 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 333 \text{ nm}$

Las longitudes de onda máximas, tanto de excitación como de emisión, obtenidas mediante estos barridos, así como los incrementos de las intensidades de fluorescencia en los diferentes medios micelares (I), respecto a la fase acuosa (I_0), se presentan en las Tablas XII y XIII.

Tabla XII.- Características fluorimétricas de los PCBs en los diferentes medios micelares

	Genapol X-080			Brij 30			Brij 35			Brij 56			Brij 76			Brij 97			POLE		
	λ_{ex}	λ_{em}	I/I ₀	λ_{ex}	λ_{em}	I/I ₀	λ_{ex}	λ_{em}	I/I ₀	λ_{ex}	λ_{em}	I/I ₀	λ_{ex}	λ_{em}	I/I ₀	λ_{ex}	λ_{em}	I/I ₀	λ_{ex}	λ_{em}	I/I ₀
BF	246	315	1.0	247	315	1.0	247	315	1.0	247	316	1.0	248	317	1.0	246	315	1.0	254	318	1.7
MBF	252	321	1.0	254	321	0.8	257	322	1.0	252	322	1.0	255	323	1.0	254	321	1.0	256	323	1.0
DBF	257	323	2.6	258	215	2.0	257	326	1.3	258	326	1.3	265	327	3.0	258	324	0.8	260	327	2.5
TriBF	263	328	7.0	259	328	6.7	258	327	4.6	264	327	4.6	264	328	9.0	264	328	1.0	261	328	8.0
TBF	263	330	14.0	262	330	15.0	263	330	10.0	260	330	10.0	263	331	14.0	261	330	1.0	262	330	2.6
PBF	266	332	2.0	258	360	1.0	268	333	1.0	269	332	1.0	266	332	10.0	264	329	0.7	265	332	7.5
HBF	257	355	1.4	265	338	3.0	267	336	1.0	267	352	1.0	284	335	16.0	256	353	1.0	264	335	1.5

* Las longitudes de onda, λ_{ex} y λ_{em} , vienen dadas en nm.

Tabla XIII.- Características fluorimétricas de los PCDFs en los diferentes medios micelares

	Genapol X-080			Brij 30			Brij 35			Brij 56			Brij 76			Brij 97			POLE		
	λ_{ex}	λ_{em}	I/Io	λ_{ex}	λ_{em}	I/Io	λ_{ex}	λ_{em}	I/Io	λ_{ex}	λ_{em}	I/Io	λ_{ex}	λ_{em}	I/Io	λ_{ex}	λ_{em}	I/Io	λ_{ex}	λ_{em}	I/Io
DBFo	278	316	1.0	278	316	1.0	278	316	1.0	278	316	1.0	278	316	1.0	278	315	1.0	280	316	1.0
1-CDF	265	333	5.0	271	331	1.2	280	321	3.0	274	323	2.0	280	320	2.0	278	320	1.3	280	321	5.0
2-CDF	255	334	3.0	279	332	2.5	291	334	7.0	251	335	1.5	290	333	2.0	279	334	1.4	292	333	7.0
3-CDF	256	335	2.0	256	336	3.0	291	337	10.0	256	333	2.0	288	338	3.0	254	338	1.5	291	337	13.0
4-CDF	258	335	3.0	298	350	5.5	302	337	10.0	259	335	1.0	298	334	3.0	256	337	1.0	303	336	32.0
5-CDF	258	335	5.0	294	345	7.0	294	344	7.0	259	335	1.0	299	334	3.0	257	337	2.4	295	344	13.0

* Las longitudes de onda, λ_{ex} y λ_{em} , vienen dadas en nm.

Para la determinación de los diferentes PCBs y PCDFs en mezclas mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia - Detección Fluorescente, ha sido necesario establecer unas nuevas condiciones fluorescentes para los diversos analitos. Las longitudes de onda máximas establecidas para los diversos medios micelares utilizados, así como en medio acuoso, se muestran en la Tabla XIV. Estas longitudes se establecieron teniendo en cuenta las longitudes máximas individuales en cada caso, y tomando una longitud de onda intermedia, considerada como la más adecuada para los diferentes analitos de cada grupo.

Tabla XIV.- Longitudes de onda óptimas para muestras que contienen mezclas de los diferentes analitos en estudio.

	Agua		Genapol X-080		POLE	
	λ_{ex}	λ_{em}	λ_{ex}	λ_{em}	λ_{ex}	λ_{em}
BF DBFo	260	315	260	316	260	316
MBF 1-CDF DBF 2-CDF TriBF	270	325	270	325	260	330
TBF 3-CDF	270	341	270	335	260	330
PBF 4-CDF	300	335	303	336	260	335
HBf	259	306	264	335	267	352
5-CDF	300	336	295	344	258	335

* Las longitudes de onda, λ_{ex} y λ_{em} , vienen dadas en nm.

4.- Optimización de la metodología de separación por Cromatografía Líquida

Tanto los PCBs como los PCDFs son compuestos altamente tóxicos, pero dentro de los mismos existen congéneres con mayor o menor grado de toxicidad. Esto hace que sea necesaria la identificación de cada uno de ellos, puesto que sus niveles permitidos varían. Además, no sólo es necesaria su identificación dentro de la misma familia, sino cuando se encuentran en mezclas que contienen compuestos de diversa naturaleza e importancia.

Por tanto, a la hora de analizar una muestra para determinar estos compuestos, la presencia de gran cantidad de compuestos adicionales a los mismos, hace necesaria la aplicación de metodologías que permitan su separación o aislamiento. Pero además de esta preselección, se hace necesaria la identificación individual de cada uno de los analitos en la muestra tanto para la realización de análisis de carácter cualitativo como cuantitativo.

La principal técnica que permite la separación (bien como pre-extracción o como técnica de identificación) es la Cromatografía. Esta técnica de separación, en todas sus diversas clases (cromatografía de gases, líquida, de papel, en columna, etc.), se basa en procesos sencillos y teniendo siempre en cuenta las diferentes características y propiedades de los analitos que se desean separar.

Un punto importante a tener en cuenta a la hora de realizar los análisis pertinentes, es el conocimiento de las limitaciones impuestas bien por el tipo de muestra con la que se trabaje, o bien por el medio en el que los compuestos se extraen. Por ejemplo, cuando se trabaja con cromatografía de gases, los analitos deben estar en muestras que puedan pasar a estado gaseoso sin descomponerse; en cromatografía líquida, las muestras a analizar deben estar en forma líquida, etc. De todas estas metodologías aquellas que mayor

aceptación o mayor aplicación tienen, son la cromatografía de gases y la cromatografía líquida.

En las investigaciones realizadas a lo largo del desarrollo de esta Tesis, se ha trabajado con diferentes matrices, pero todos los procesos de extracción se han llevado a cabo con medios micelares. Por tanto, es necesaria la aplicación de una técnica que además de una buena separación, reduzca los problemas que puedan generarse entre la fase móvil y el medio en el que la muestra se encuentra. Esta técnica es la Cromatografía Líquida, la cual presenta una fase móvil líquida, que es compatible con el medio micelar en el que se encuentran los analitos una vez extraídos.

Una vez que tenemos establecida la técnica de separación, es necesario optimizar la misma para alcanzar los mejores resultados.

4.1.- Establecimiento de los parámetros que controlan la separación.

La separación, y posterior determinación, de los diferentes analitos objeto de estudio en esta Tesis (PCBs y PCDFs), se ha llevado a cabo mediante la utilización de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), y como en todas las técnicas de análisis, es necesario realizar un estudio que permita optimizar los diferentes parámetros que intervienen en la misma, para poder mejorar los resultados. En HPLC la optimización de la metodología requiere:

1.- Buena resolución entre los picos que representan los diferentes analitos. Para ello se debe optimizar principalmente, la composición de fase móvil, que controlará en mayor o menor medida las interacciones analito - fase estacionaria, que son las que permitirán una mejor o peor separación de los compuestos.

2.- Tiempo de análisis relativamente corto. Los análisis deben realizarse en el menor tiempo posible, para lo cual se debe establecer un flujo de fase móvil adecuado.

Por todo ello, la optimización del proceso de separación por HPLC, se habrá obtenido cuando se establezcan las condiciones de composición y flujo de la fase móvil, que permitan una buena resolución y un tiempo de análisis relativamente corto.

El estudio realizado para este fin, ha consistido en establecer las condiciones de composición de la fase móvil metanol:agua (v/v), que permita el análisis tanto cualitativo, como cuantitativo de los diferentes analitos. Las condiciones iniciales se establecieron en un flujo de 1 ml.min.⁻¹ y una fase móvil de metanol al 100% (v/v). Para la determinación de los PCBs se inyectaron en el cromatógrafo diversas disoluciones que contenían mezclas de los siete analitos en estudio. Tras comprobar que con estas condiciones no se obtenía una separación satisfactoria se varió la proporción de agua añadida a la fase móvil. La composición de la fase móvil fue variándose hasta alcanzar una relación adecuada entre separación de los analitos y el tiempo de análisis. Estas condiciones son:

- 1.- Fase móvil: Metanol:Agua (85:15 v/v)
- 2.- Flujo: 1 ml.min⁻¹

Un ejemplo del resultado obtenido bajo estas condiciones se muestra en la Figura 18, donde se puede observar una adecuada separación de los analitos que nos permite realizar tanto análisis de carácter cualitativo como cuantitativo de los mismos.

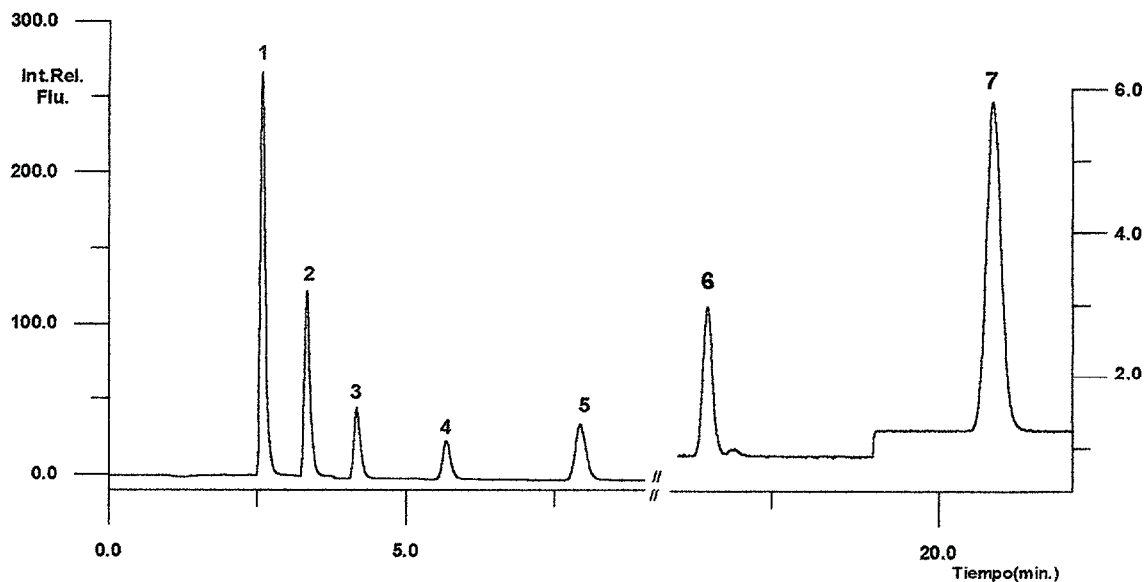


Figura 18.- Elución de los diferentes PCBs en condiciones de fase móvil metanol:agua (85:15 v/v) y flujo de 1 ml.min⁻¹

1.- BF; 2.- MBF; 3.- DBF; 4.- TriBF; 5.- TBF; 6.- PBF; 7.- HBF

Para la determinación de los seis PCDFs, se realizó nuevamente el estudio descrito previamente. Tras obtener las mejores condiciones de separación, se comprobó que éstas son las mismas que las establecidas para el análisis de los PCBs. El cromatograma obtenido en el análisis de una mezcla de seis PCDFs, bajo las condiciones óptimas establecidas, se muestra en la Figura 19.

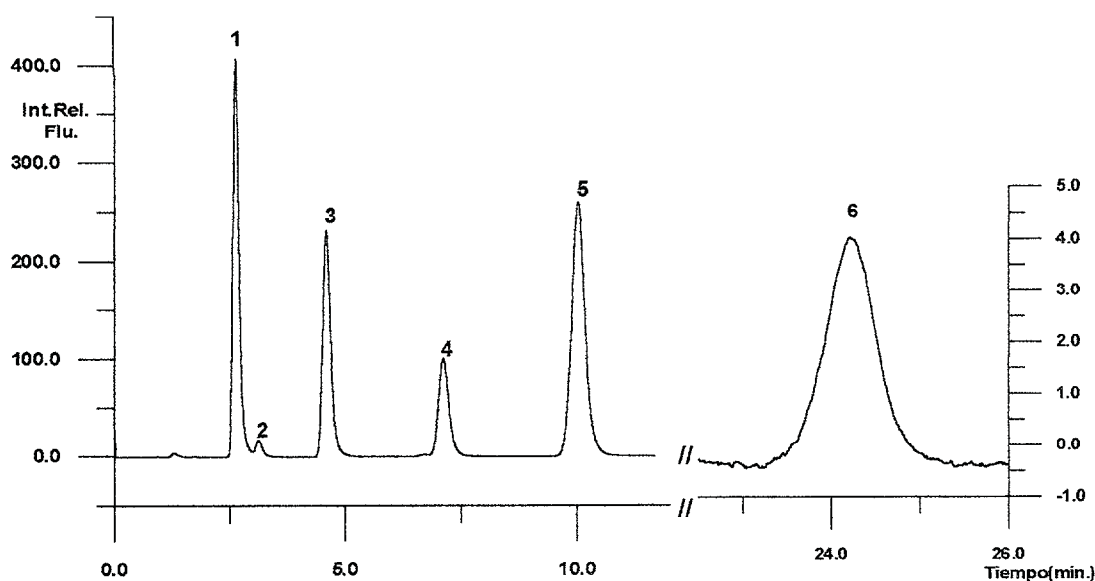


Figura 19.- Elución de los diferentes PCDFs en condiciones de fase móvil metanol:agua (85:15 v/v) y flujo de 1 ml.min⁻¹

1.- DBFo; 2.- 1-CDF; 3.- 2-CDF; 4.- 3-CDF; 5.- 4-CDF; 6.- 5-CDF

En el caso del análisis de los diversos analitos presentes en muestras que contienen mezclas de PCBs y PCDFs conjuntamente, el estudio realizado ha sido similar. Pero en este caso se ha observado que las condiciones isocráticas previas no son las más adecuadas, puesto que bajo estas condiciones, aparecen picos solapados o enmascarados por analitos vecinos. Debido a esto, ha sido necesario establecer nuevas condiciones cromatográficas para esta mezcla, utilizándose un sistema en gradiente. La optimización de las condiciones de un sistema en gradiente, requiere no sólo variar la composición de la fase móvil a lo largo del tiempo, sino también el establecer unos intervalos de tiempo para cada composición. Tras diversas modificaciones de estos dos parámetros, la mejor resolución se obtiene para las condiciones de fase móvil metanol:agua (v/v) 75:25 (0-6 min.), 85:15 (6-10 min.) y 90:10 (10-30 min), y flujo de 1

ml.min⁻¹. Bajo estas condiciones se ha logrado identificar 11 de los 13 analitos presentes en la mezcla. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 20.

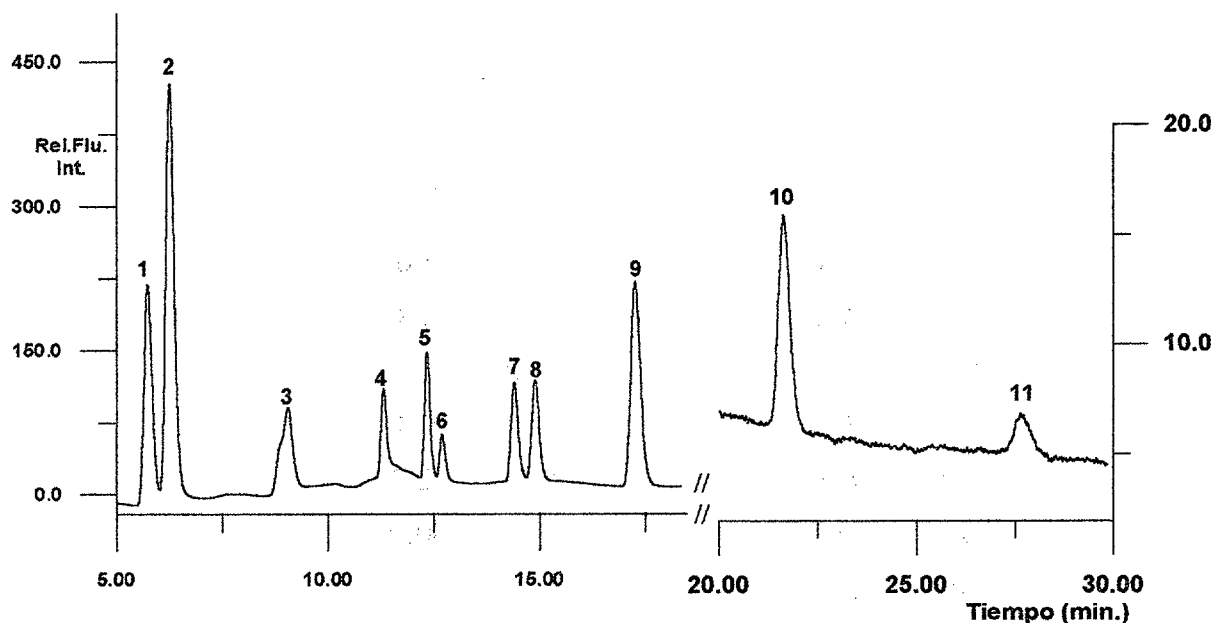


Figura 20.- Elución de una mezcla de siete PCBs y seis PCDFs, bajo condiciones de gradiente.

1.- BF; 2.- DBFo; 3.- MBF; 4.- 1-CDF; 5.- DBF; 6.- TriBF; 7.- 3-CDF; 8.- TBF;
9.- 4-DCF; 10.- HBF; 11.- 5-CDF

4.2.- Características analíticas de los métodos de separación.

4.2.1- Tiempos de retención

Los tiempos de retención característicos para cada compuesto, por un lado la familia de los PCBs, y por otro para los PCDFs, se obtuvieron inyectando varias réplicas (n=5) y calculando la media de los tiempos obtenidos en cada caso, bajo las condiciones óptimas de análisis previamente establecidas para cada familia de analitos por separado. La variación de estos

tiempos, en función del medio micelar utilizado, no es significativa. Los resultados obtenidos para los diferentes analitos integrantes de cada familia en estudio, se muestran en la Tabla XV.

Tabla XV.- Tiempos de retención para las familias de los diferentes analitos en estudio.

Analito	t_r^*	$\sigma^{\#}$
BF	2.5	0.034
MBF	3.3	0.057
DBF	4.3	0.025
TriBF	5.7	0.021
TBF	8.3	0.011
PBF	13.7	0.011
HBf	22.0	0.050

Analito	t_r^*	$\sigma^{\#}$
DBFo	2.9	0.007
1-CDF	3.5	0.011
2-CDF	5.4	0.006
3-CDF	8.5	0.009
4-CDF	12.2	0.031
5-CDF	30.0	0.065

* Tiempo de retención en minutos. Media de cinco valores.

Desviación Estandar

En el caso de una mezcla de PCBs y PCDFs, los tiempos de retención que van a caracterizar a los analitos son diferentes a los obtenidos anteriormente. Esta diferencia es debida a la variación de las condiciones cromatográficas utilizadas para determinación de los mismos; se ha pasado de unas condiciones isocráticas, a otras de gradiente. Los tiempos de retención de cada compuesto de la mezcla se muestran junto a los tiempos individuales en la Tabla XVI.

Tabla XVI.- Tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla

Analito	t_r^*	$\sigma^{\#}$
BF	5.72	0.011
DBFo	6.24	0.021
MBF	9.04	0.032
1-CDF	11.3	0.024
DBF	12.32	0.016
TriBF	12.69	0.012
TBF	14.39	0.013
3-CDF	14.88	0.021
4-CDF	17.25	0.011
HBf	21.64	0.019
5-CDF	27.62	0.021

* Tiempo de retención en minutos. Media de cinco valores.

Desviación Estandar

4.2.2.- Curvas de calibrado

Con la finalidad de establecer el intervalo de concentraciones en el que se observa una relación lineal entre la intensidad relativa de fluorescencia y la concentración de analito, se han realizado las correspondientes curvas de calibrado en los diferentes intervalos de concentración requeridos dependiendo del tipo de matriz que se desea analizar. Teniendo esto en cuenta, se han establecido dos intervalos distintos para el estudio de muestras acuosas, y un único intervalo, inferior a los anteriores, para la determinación de los compuestos en muestras sólidas (sedimentos y organismos). Esta distinción, se debe al hecho de que las concentraciones a determinar cuando se trabaja en sedimentos, se ven reducidos por la propia metodología.

Es necesario destacar que la intensidad relativa de fluorescencia que presentan los analitos, varía en función del medio micelar utilizado. Por tanto, será necesario establecer una curva de calibrado para cada uno de los compuestos en estudio, en los diferentes surfactantes utilizados como extractantes.

Los parámetros obtenidos para las diferentes curvas de calibrado establecidas para la determinación de los PCBs, tanto en muestras acuosas como en sedimentos, se muestran en las Tabla XVII. Los coeficientes de correlación no se muestran en esta tabla, puesto que para todas las curvas se obtuvieron valores superiores a 0.999.

Tabla XVII.- Características de las rectas de calibrado obtenidas para la determinación cuantitativa de PCBs en diferentes intervalos de concentración.

A) Intervalo $0.01-0.1 \times 10^{-5} \text{M}$ (para muestras en sedimentos marinos)

Analito	Genapol X-080		POLE	
	A*	B [#]	A*	B [#]
BF	23.4	0.56	20.2	21.9
MBF	4.52	-0.12	4.38	0.07
DBF	4.70	0.27	4.56	1.65
TriBF	2.78	-0.15	3.48	-0.33
TBF	7.42	0.42	8.38	-0.14
PBF	2.53	-1.09	3.04	-1.45
HBf	0.88	-0.2	3.03	-1.24

A*: Pendiente ($\times 10^{-6}$) ;B[#]: Ordenada en el origen ($\times 10^{-5}$)

b)Rango: 0.2 – 1.0x10⁻⁵ M

Analito	Genapol X-080		Brij 30		Brij 35		Brij 56		Brij 76		Brij 97	
	A*	B#	A*	B#	A*	B#	A*	B#	A*	B#	A*	B#
BF	23.8	3.35	25.20	2.20	24.0	9.51	21.8	0.69	16.5	6.15	22.6	4.85
MBF	12.5	2.80	12.70	4.27	4.74	1.19	14.2	0.68	9.33	2.11	13.9	4.30
DBF	59.3	1.57	5.69	1.12	6.39	1.17	14.9	1.82	4.91	-0.19	14.4	0.16
TriBF	2.94	-0.29	3.80	1.05	2.85	-0.02	2.81	-0.26	2.72	1.05	2.78	2.01
TBF	7.81	7.20	7.71	0.38	9.88	2.52	8.25	1.29	7.64	3.46	1.54	0.20
PBF	2.39	0.06	0.68	0.29	2.42	-0.59	2.00	-0.22	2.21	1.37	2.43	0.85
HBf	0.92	-0.13	2.24	0.37	2.41	1.66	0.91	-0.49	0.86	0.34	0.88	0.01

A*: Pendiente (x 10⁻⁴); B#: Ordenada en el origen (x10⁻⁴)

c) Rango: $2.0 - 8.0 \times 10^{-5}$ M

Analito	Genapol X-080		Brij 30		Brij 35		Brij 56		Brij 76		Brij 97	
	A*	B	A*	B#	A*	B#	A*	B#	A*	B#	A*	B#
BF	1.87	1.94	1.93	8.94	2.16	5.95	1.99	2.45	1.27	1.85	1.83	5.08
MBF	0.74	5.96	0.80	7.01	0.34	0.60	0.81	4.20	0.59	2.83	0.81	4.90
DBF	0.54	0.90	0.42	1.54	0.46	1.09	0.47	1.53	0.32	0.81	0.47	2.27
TriBF	0.23	0.54	0.28	2.88	2.02	6.11	0.31	0.21	0.25	1.82	0.21	-0.08
TBF	7.2	1.13	0.65	-0.38	0.34	0.60	0.61	1.11	0.54	1.12	0.58	0.39
PBF	0.21	-0.13	0.052	-0.031	0.19	-0.02	0.19	0.34	0.20	0.18	0.20	0.41
HBf	0.17	0.12	0.15	1.07	0.31	-0.09	0.15	-0.09	0.17	0.12	0.13	-0.10

A*: Pendiente ($\times 10^{-4}$); B#: Ordenada en el origen ($\times 10^{-4}$)

En el caso de los PCDFs se ha podido comprobar que las variaciones de la intensidad de fluorescencia debidas a la presencia de los diferentes surfactantes no son significativas, por lo que se ha establecido una curva de calibrado para cada analito, independientemente del tipo de surfactante utilizado en la extracción. Esta curva de calibrado se ha obtenido utilizando, para cada una de las concentraciones que componen la curva, todos los puntos obtenidos para los diferentes surfactantes estudiados. Estos resultados se muestran en la Tabla XVIII. Los coeficientes de correlación se han omitido puesto que todas las curvas presentan valores superiores a 0.999.

Tabla XVIII.- Características de las rectas de calibrado obtenidas, en distintos intervalos, para la determinación cuantitativa de los PCDFs.

		DBF ₀	1-CDF	2-CDF	3-CDF	4-CDF	5-CDF
1	A* x10 ⁵	4.47	0.16	1.17	1.12	3.4	0.12
	B# x10 ⁴	6.07	0.04	0.09	0.93	0.39	0.06
2	A* x10 ⁵	11.8	0.64	11.2	6.18	25.2	0.78
	B# x10 ⁵	4.00	0.13	1.00	0.38	1.10	0.18
3	A* x10 ⁵	1.22	0.59	1.03	5.80	2.36	0.07
	B# x10 ⁵	1.48	0.15	1.39	3.66	0.11	0.07

1: Intervalo 0.01-0.1x10⁻⁵ M; 2: Intervalo 0.2 – 1.0x10⁻⁵ M; 3: Intervalo 2.0 – 8.0x10⁻⁵ M;
A*: Pendiente, B#: Ordenada en el origen

Para la determinación de los diferentes analitos en las mezclas, se establecieron nuevas curvas de calibrado, puesto que las condiciones son diferentes. Para estas curvas de calibrado, las condiciones fluorescentes son las establecidas en la Tabla XIV. Los diferentes parámetros obtenidos para este caso, se muestran en la Tabla XIX. En este caso se utilizaron dos surfactantes,

puesto que se realizó para el estudio de los diferentes analitos en muestras de sedimento, y en este estudio solo se trabajó con estos dos medios micelares.

Tabla XIX.- Parámetros de las curvas de calibrado para la resolución de mezclas de PCBs y PCDFs.

Analito	Geapol X-080		POLE	
	A*	B [#]	A*	B [#]
BF	1.46	8.46	1.480	0.88
DBFo	3.19	2.67	3.19	1.66
MBF	0.40	3.04	4.42	5.24
1-CDF	0.44	8.29	3.49	2.72
DBF	0.27	1.76	4.33	1.85
TriBF	0.25	2.52	2.53	6.28
TBF	0.84	0.12	4.38	14.3
3-CDF	0.42	0.19	3.85	9.44
4-CDF	1.67	3.15	2.89	10.2
HBf	0.10	-0.09	0.17	0.02
5-CDF	0.08	-1.03	0.10	0.01

A*: Pendiente ($\times 10^{-5}$)

B[#]: Ordenada en el origen ($\times 10^{-4}$)

5.- Establecimiento de las condiciones óptimas de extracción por “Punto de Nube”

A la hora de establecer las condiciones óptimas de trabajo en una nueva metodología se deben estudiar todos aquellos factores que intervienen o afectan en el proceso. La metodología de extracción por “*punto de nube*” se ve influenciada principalmente por tres factores principales: el tiempo de equilibración, la concentración de analito en disolución y la concentración de surfactante utilizada en el proceso [100].

5.1.- Efecto del tiempo de equilibración en los porcentajes de recuperación

Como se ha indicado anteriormente, el “tiempo de equilibración” es el tiempo en el cual se mantiene la muestra en las condiciones que permiten la separación de las fases. Durante este periodo los analitos interaccionan con las micelas de surfactante, y se produce la partición de las moléculas de compuesto entre la fase acuosa y la fase rica en surfactante. En función del tiempo en el que se mantienen estas condiciones el equilibrio que se establece se verá afectado, y por tanto el porcentaje de analito que se extraerá en la fase rica en surfactante.

El estudio para conocer la influencia de este factor, y que nos permitirá establecer el tiempo más adecuado para obtener la máxima recuperación, se ha realizado sometiendo a diferentes muestras que contenían los distintos analitos, al proceso de extracción por punto de nube, para diferentes tiempos de equilibración: 10, 13, 15, 20 y 25 minutos.

5.1.1.- Efecto sobre los PCBs

Debido a las diferentes características que presenta cada surfactante, los resultados obtenidos para cada uno de ellos son distintos, y por tanto, se comentarán por separado.

5.1.1.1- Genapol X-080

Si se representan los porcentajes de extracción obtenidos para cada uno de los analitos en estudio, frente a los tiempos en los que se ha mantenido la muestra bajo las condiciones de separación (Figura 21), observamos que existen dos comportamientos claramente diferenciados, que prácticamente se mantienen para altas y bajas concentraciones. Para la mayoría de los PCBs estudiados, se observa un aumento de los porcentajes de recuperación con el tiempo, hasta alcanzar un máximo para un tiempo de 15 minutos, a partir del cual las recuperaciones disminuyen.

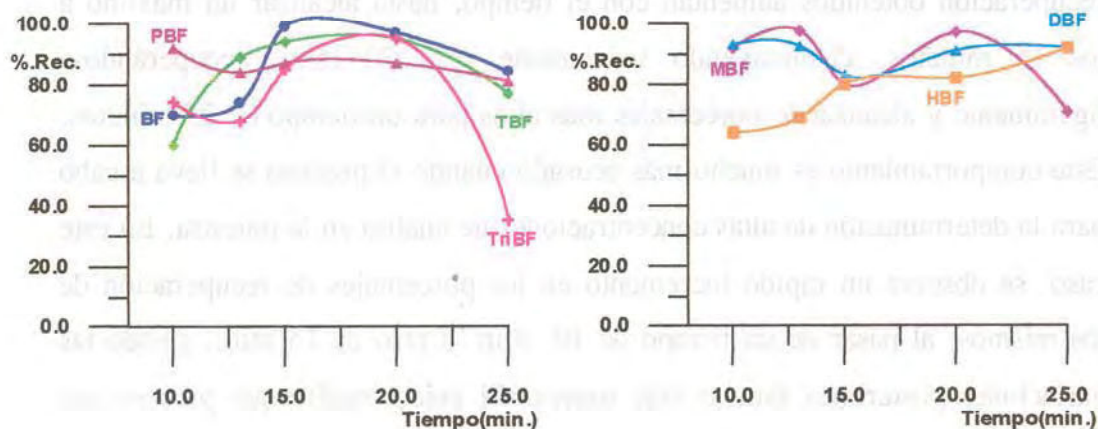
Por el contrario, para el MBF, DBF y HBF, obtenemos un comportamiento fluctuante, con variaciones para los dos intervalos de concentración:

- Para el caso de muestras donde los analitos se encuentran en bajas concentraciones se pueden observar dos comportamientos, y se obtienen dos tiempos diferentes para los cuales los porcentajes de recuperación son máximos, y que se corresponden con 13 y 20 minutos.
- A altas concentraciones se observa que a medida que aumenta el tiempo de equilibración el porcentaje de recuperación disminuye ligeramente hasta los 15 min. A partir de este tiempo vuelve a aumentar, alcanzándose los mejores resultados para un tiempo de extracción igual o superior a 20 minutos.

Estos dos comportamientos diferenciados tienen como consecuencia principal que a la hora de realizar la determinación de los PCBs presentes en una muestra mediante la técnica de extracción y preconcentración por punto de nube, sea necesario realizar varias veces el proceso, de forma que se obtengan los datos más precisos posibles. Los tiempos de equilibración con los que debemos trabajar serán de 15 minutos para los analitos que componen el primer grupo, y de 20 minutos para los analitos que componen el segundo, puesto que

en el caso de altas concentraciones, para estos últimos, las variaciones entre 20 y 25 minutos no son significativas.

a) Bajas Concentraciones



b) Altas Concentraciones

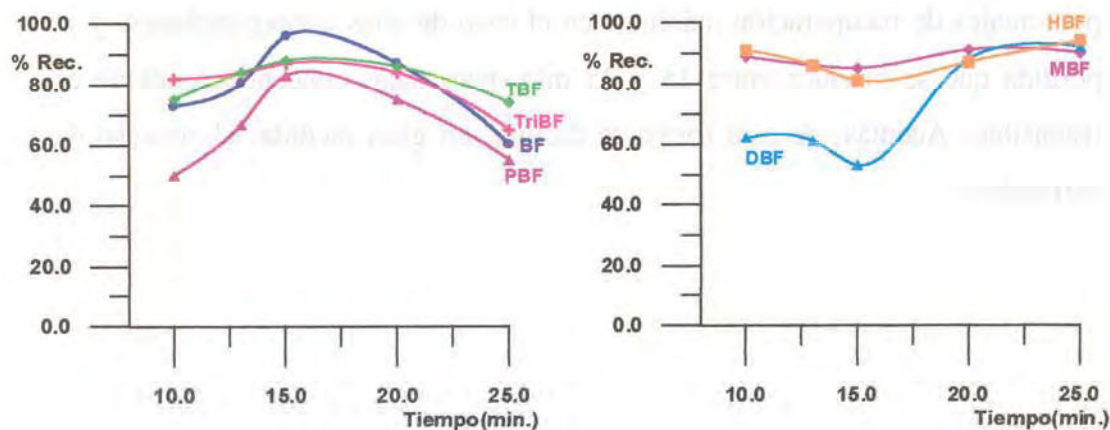


Figura 21.- Efecto del tiempo de equilibración en los porcentajes de recuperación de los PCBs en estudio utilizando Genapol X-080 como extractante.

5.1.1.2.- Brij 30

Cuando utilizamos el Brij 30 como medio extractante, encontramos que todos los analitos en estudio presentan un mismo comportamiento frente a la variación del tiempo de equilibración, para todo el intervalo de concentraciones estudiado. Como puede observarse en la Figura 22, los porcentajes de recuperación obtenidos aumentan con el tiempo, hasta alcanzar un máximo a los 15 minutos, disminuyendo suavemente para 20 min., recuperándose ligeramente y alcanzando porcentajes más altos para un tiempo de 25 minutos. Este comportamiento es mucho más acusado cuando el proceso se lleva a cabo para la determinación de altas concentraciones de analito en la muestra. En este caso, se observa un rápido incremento en los porcentajes de recuperación de los mismos, al pasar de un tiempo de 10 min. a otro de 15 min., siendo las variaciones posteriores mucho más suaves. El único analito que presenta un comportamiento algo diferente es el TBF donde la disminución del porcentaje de recuperación pasados los 15 min. es más acusado.

El tiempo que se establece para aplicaciones posteriores de la metodología extracción y preconcentración por punto de nube, a partir de estas gráficas, se establece en 15 min., puesto que para este tiempo se obtienen los porcentajes de recuperación máximos en el caso de altas concentraciones, y la pérdida que se produce entre 15 y 25 min. para bajas concentraciones no es ostensible. Además, de esta forma se facilita, en gran medida, el proceso de extracción.

a) Bajas Concentraciones

b) Altas Concentraciones

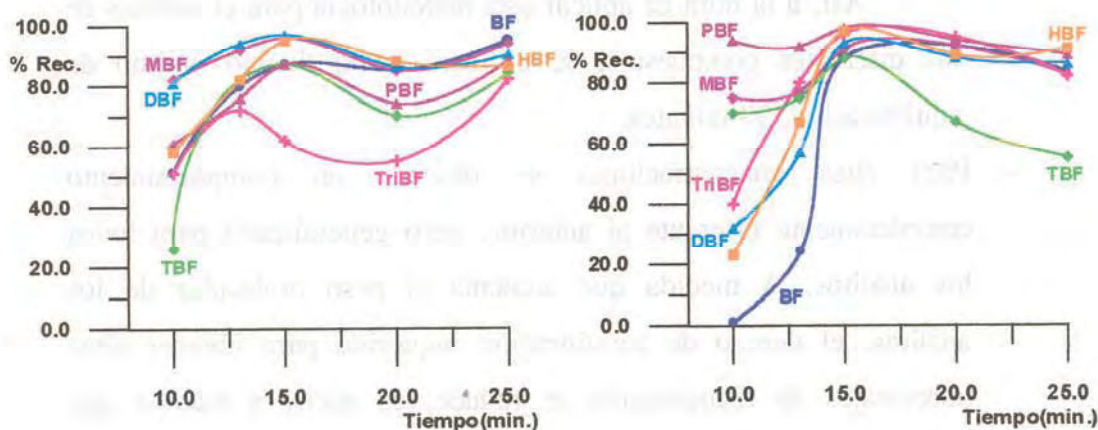


Figura 22.- Variación de los porcentajes de recuperación de los PCBs en estudio frente al tiempo de equilibración, cuando se utiliza Brij 30 como extractante.

5.1.1.3.- Brij 56

Al igual que en el caso del Genapol X-080, para el Brij 56 se obtienen dos comportamientos claramente diferenciados:

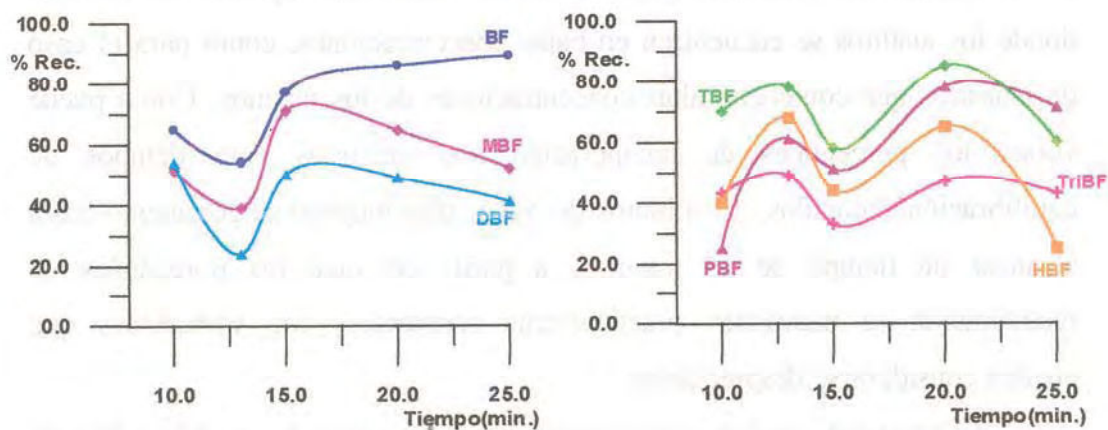
- Cuando las muestras que contienen bajas concentraciones de analito, se someten al proceso de extracción por punto de nube, los resultados nos indican que para aquellos analitos de menor peso molecular, BF, MBF, DBF, el comportamiento es diferente al de los restantes compuestos en estudio. Como se puede observar en la Figura 23, el tiempo necesario para que se produzca la máxima recuperación puede establecerse en 15 minutos, aunque para el caso del BF el porcentaje obtenido para un tiempo de 25 minutos es ligeramente superior. Los restantes analitos estudiados presentan un comportamiento variable con el tiempo, alternándose altos y bajos

porcentajes de recuperación. Para estos analitos, las máximas recuperaciones se obtienen para tiempos de 13 y 20 minutos, aunque los resultados son superiores para este último tiempo.

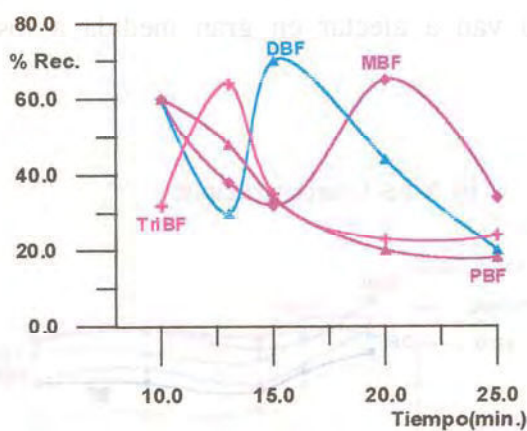
Así, a la hora de aplicar esta metodología para el análisis de los diferentes compuestos, se utilizará como tiempo óptimo de equilibración, 20 minutos.

- Para altas concentraciones se observa un comportamiento completamente diferente al anterior, pero generalizado para todos los analitos. A medida que aumenta el peso molecular de los analitos, el tiempo de equilibración requerido para obtener altos porcentajes de recuperación se reduce, es decir, a medida que aumenta el número de átomos de cloro en la molécula, son menores los tiempos que deben estar los analitos sometidos al proceso de punto de nube para obtener recuperaciones altas.

a) Bajas Concentraciones



b) Altas Concentraciones



Se han representado algunos de los analitos estudiados, puesto que los compuestos presentan un mismo comportamiento agrupados en parejas.

Figura 23.- Efecto del tiempo de equilibración en los porcentajes de recuperación de los PCBs en estudio utilizando Brij 56 como extractante.



5.1.1.4.- Brij 97

Si se observa la Figura 24, se comprueba que el comportamiento presentado por los diferentes PCBs es similar, tanto para aquellas disoluciones donde los analitos se encuentren en bajas concentraciones, como para el caso de muestras que contengan altas concentraciones de los mismos. Como puede verse, los porcentajes de recuperación son máximos para tiempos de equilibración reducidos, 10 minutos de baño, disminuyendo ligeramente hasta alcanzar un tiempo de 15 minutos, a partir del cual los porcentajes de recuperación se mantienen prácticamente constantes, con variaciones que pueden considerarse despreciables.

El tiempo de equilibración óptimo, para el caso en que se utilice Brij 97 como medio micelar para la extracción y preconcentración de los PCBs, se establece en 15 minutos. Se establece este tiempo teniendo presente que para el mismo se obtienen buenos porcentajes de recuperación, y además las pequeñas variaciones que pueden producirse no van a afectar en gran medida a los resultados obtenidos.

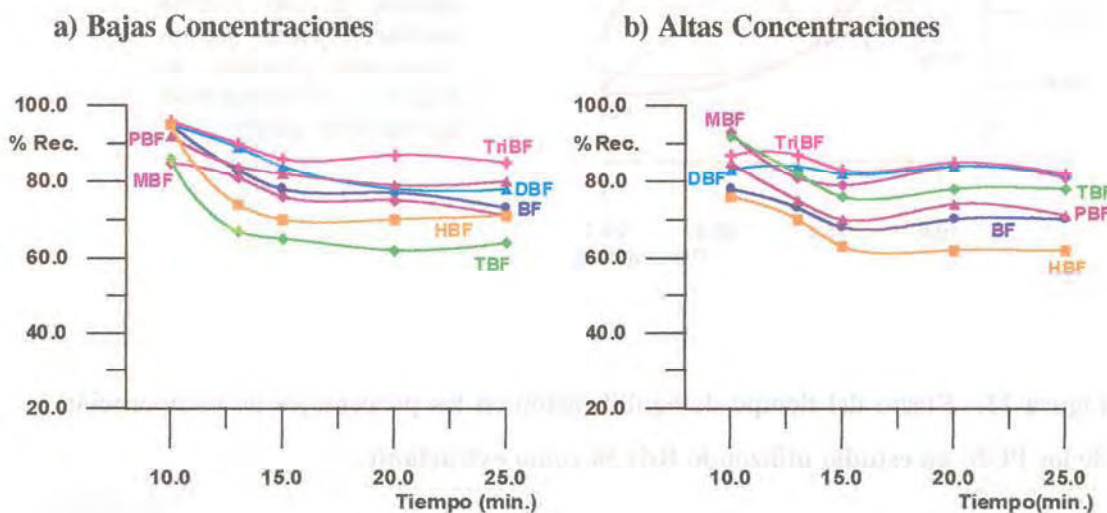


Figura 24.- Variación de los porcentajes de recuperación con respecto al tiempo de equilibración de los PCBs en estudio utilizando Brij 97 como medio micelar.

5.1.2.- Efecto sobre los PCDFs

Para los diferentes PCDFs en estudio, se ha realizado el mismo proceso que en el caso tratado para los PCBs. A diferencia del estudio anterior, en este caso sólo se han utilizado dos surfactantes, el Genapol X-080 y el Brij 56, que darán una idea de la aplicabilidad, o no, de la metodología del punto de nube para la extracción y preconcentración de la familia de los PCDFs. Se han elegido estos dos surfactantes, porque se ha podido comprobar en los estudios realizados con los PCBs que dichos surfactantes conducen a comportamientos diferentes. De esta forma, podremos comprobar si presentan el mismo comportamiento independientemente de los analitos estudiados, o si por el contrario, depende de la naturaleza de los mismos.

Los tiempos de equilibración estudiados en este caso, son los mismos: 10, 13, 15, 20 y 25 minutos respectivamente, al igual que los intervalos de concentración.

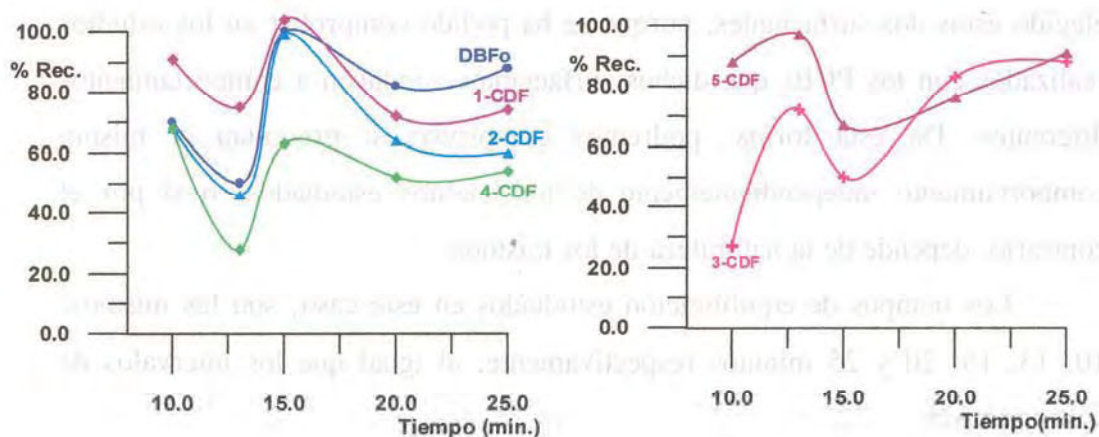
5.1.2.1.- Genapol X-080

Al utilizar Genapol X-080 como extractante, la variación en el tiempo de equilibración conlleva la aparición de variaciones en los porcentajes de recuperación de los diferentes PCDFs (Figura 25). Como puede observarse, existen dos comportamientos claramente diferenciados, que se mantiene tanto para bajas como para altas concentraciones. De esta forma, los analitos pueden agruparse en dos grupos diferentes.

Para los PCDFs que componen el primer grupo (DBFo, 1-CDF, 2-CDF, 4-CDF), observamos variaciones repetitivas a lo largo del tiempo, alternándose altos porcentajes de recuperación con otros más bajos. Para el caso de concentraciones bajas, el comportamiento presenta cambios más bruscos en los porcentajes de recuperación de unos tiempos a otros, encontrándose el menor valor a 13 minutos y el máximo a 15. El comportamiento de este grupo para altas concentraciones, es similar, siendo las

variaciones de la recuperación menos importantes, y obteniéndose un máximo para un tiempo de 15 min.

a) Bajas concentraciones



b) Altas Concentraciones

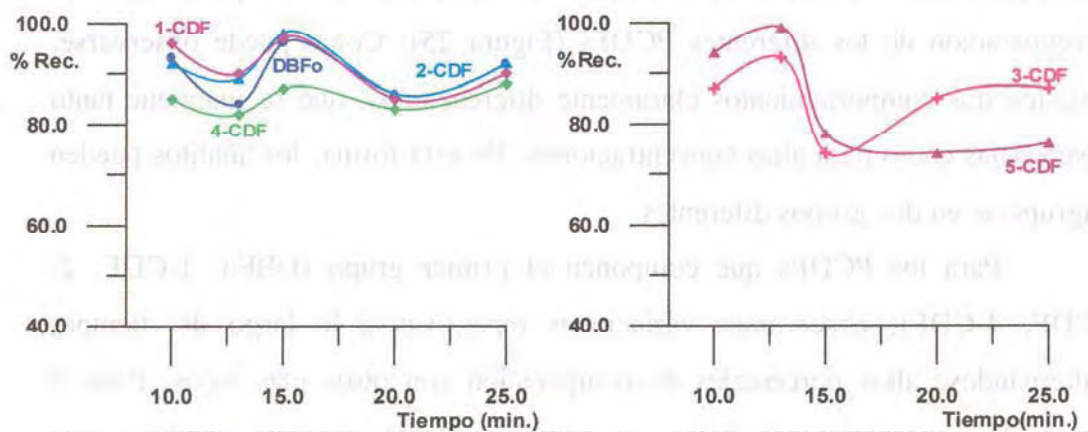


Figura 25.- Efecto del tiempo de equilibración en los porcentajes de recuperación de los PCDFs en presencia de Genapol X-080.

En el caso del 3-CDF y 5-CDF, se observa un aumento en la recuperación al pasar de 10 a 13 minutos, disminuyendo para un tiempo de 15 minutos, a partir del cual hay un ligero incremento para 20 minutos manteniéndose prácticamente constante para un tiempo superior. Al igual que para el primer grupo, estas variaciones en los porcentajes de recuperación son más acusados en el caso de bajas concentraciones. El tiempo óptimo de equilibración que se establece para este grupo de analitos es de 13 minutos.

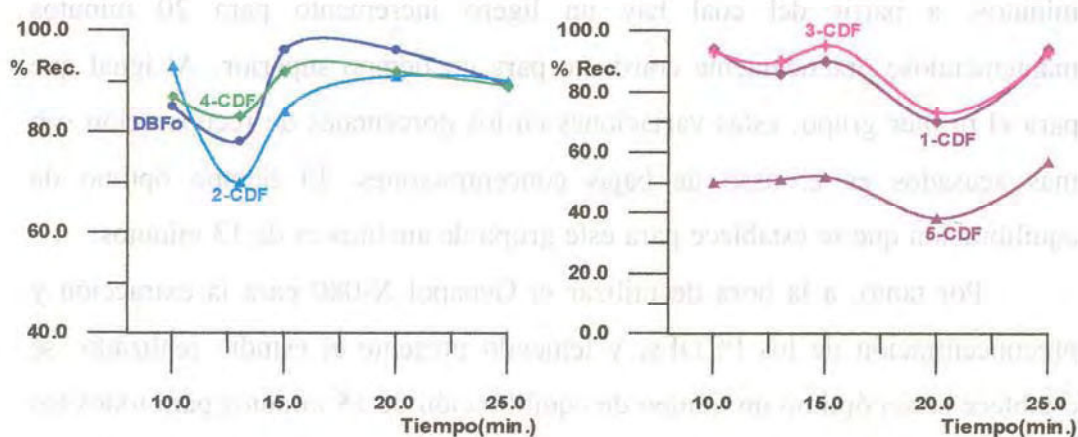
Por tanto, a la hora de utilizar el Genapol X-080 para la extracción y preconcentración de los PCDFs, y teniendo presente el estudio realizado, se establece como óptimo un tiempo de equilibración de 15 minutos para todos los analitos, puesto que lo poco que se pierde en la recuperación de algunos analitos, se gana en sencillez del proceso global.

5.1.2.2.- Brij 56

Se ha comprobado que al utilizar este medio micelar como extractante y preconcentrante para los PCBs, los porcentajes de recuperación obtenidos son bajos, mientras que el comportamiento es completamente diferente para los PCDFs. Los resultados obtenidos para los diferentes tiempos de equilibración a los que se sometieron los PCDFs se representan en la Figura 26.

El comportamiento de los diferentes analitos en estudio, frente a la variación del tiempo de equilibración, es independiente de la concentración en la que se encuentran en el medio, puesto que es similar para las muestras en las que las concentraciones iniciales son bajas y en aquellas en las cuales las concentraciones son más elevadas. Pero sí se observa una variación en cuanto al comportamiento, en función del número de átomos de cloro presentes en la molécula: compuestos con número par de átomos de cloro, y analitos con número impar de átomos de cloro en la molécula.

a) Bajas concentraciones



b) Altas concentraciones

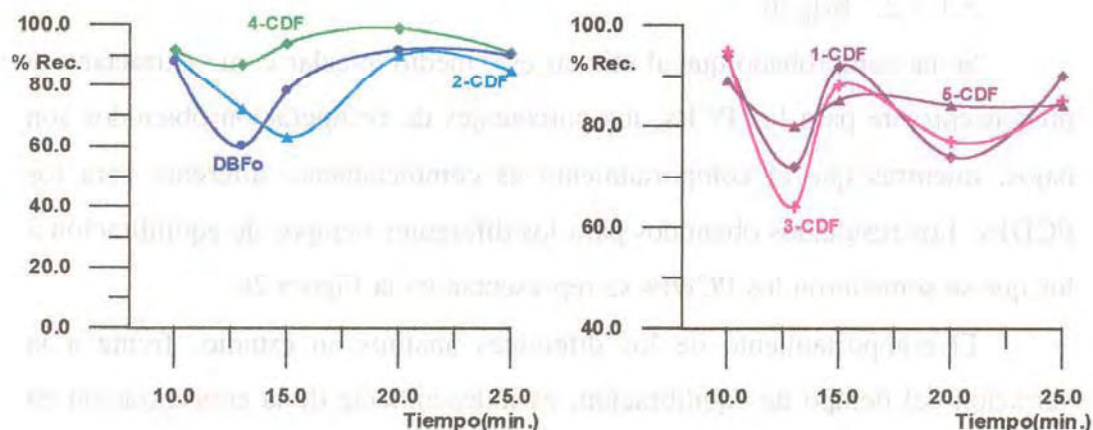


Figura 26.- Variación de los porcentajes de recuperación de los PCDFs en Brij 56 frente al tiempo de equilibración.

Como se puede observar para ambos grupos el comportamiento es similar cuando el tiempo varía entre los 10 y 15 minutos, pero la diferencia se presenta para tiempos superiores:

- Los analitos con número par de átomos de cloro en su estructura presentan una ligera disminución en los porcentajes de recuperación a medida que el tiempo de equilibración aumenta.
- Los analitos con número impar presentan una disminución mayor para 20 minutos, aumentando posteriormente las recuperaciones para un tiempo de 25 minutos.

En todos los casos obtenemos un porcentaje de recuperación máximo para un tiempo de equilibración de 15 minutos, que será el que se establezca como óptimo para posteriores estudios y análisis.

5.2.- Efecto de la concentración de analito en disolución.

Para comprobar la variación que produce la concentración de analito en los porcentajes de recuperación, se realizó un estudio que englobaba un intervalo de concentración, que comprende desde 1.0×10^{-7} hasta 1.0×10^{-5} M. De esta forma, los resultados obtenidos nos darán una visión generalizada sobre la influencia de la concentración de analito.

Al igual que para el tiempo de equilibración las diferentes muestras se sometieron al proceso de extracción por punto de nube, pero en este caso, los tiempos en los que las mismas permanecieron bajo condiciones de temperatura elevada, vienen a ser los establecidos como óptimos en el estudio anterior.

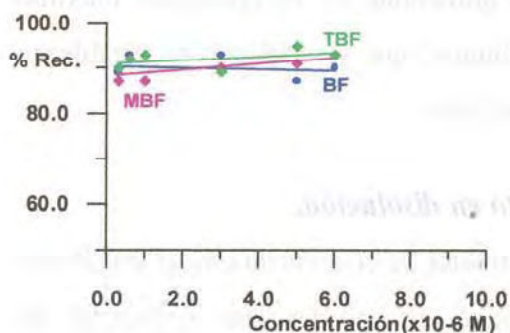
5.2.1.- Efecto sobre los PCBs

Los resultados que se muestran en la Figura 27 para los diferentes medios micelares corresponden al BF, MBF y TBF, tomados como ejemplo y representativos de todos los demás analitos de la familia que se han estudiado.

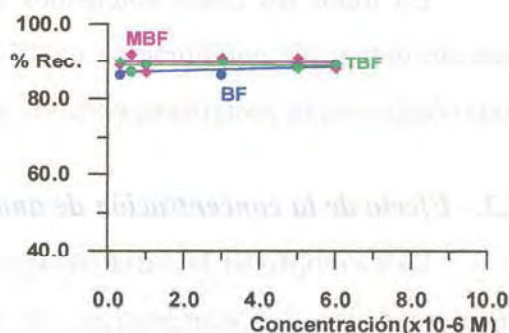
Los porcentajes de recuperación obtenidos a lo largo de este estudio no muestran variaciones significativas para las diferentes concentraciones estudiadas dentro del intervalo establecido. Este comportamiento es generalizado para los siete PCBs estudiados, cuando se utilizan el Genapol X-

080, el Brij 30 y el Brij 97 como medios micelares para la extracción. También es de reseñar, que además de presentar recuperaciones similares, los porcentajes obtenidos con los tres surfactantes son elevados, en torno al 90%.

a) Genapol X-080



b) Brij 30



c) Brij 97

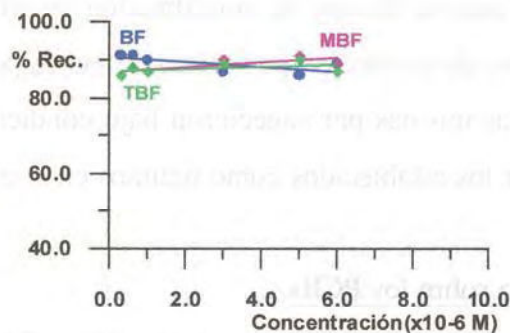


Figura 27.- Variación de los porcentajes de recuperación con la concentración de analito en disolución.

Debido a estos resultados, podemos considerar que este parámetro no tiene influencia en el proceso, y que por tanto, la metodología de extracción por punto de nube puede aplicarse para cualquier concentración inicial de analito en la disolución a analizar, siempre y cuando se utilice cualquiera de los tres surfactantes arriba mencionados.

Cuando se utiliza Brij 56 como surfactante, se observan variaciones en su eficiencia de recuperación de los diferentes analitos en estudio. Como puede observarse en la Figura 28, la concentración inicial de analito en disolución presenta cierta influencia en los porcentajes de recuperación para el intervalo de concentraciones estudiado. Las variaciones observadas son más bruscas para aquellas muestras con concentraciones de analito reducidas, mientras que para concentraciones más elevadas, las variaciones en el porcentaje de recuperación son más suaves. Por tanto, la aplicación de la metodología de extracción por punto de nube, puede presentar errores considerables al utilizar Brij 56 como extractante, cuando la concentración inicial de analito en la muestra sea pequeña.

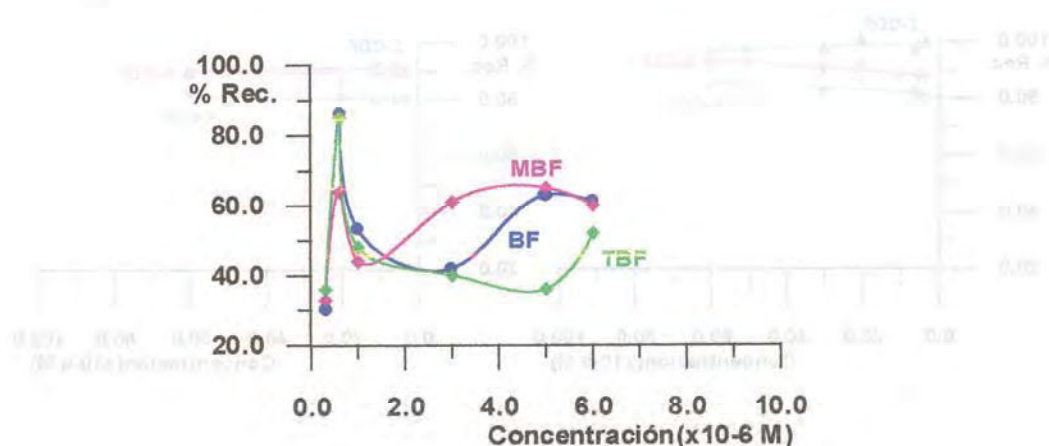


Figura 28.- Efecto de la concentración de analito en disolución sobre los porcentajes de recuperación cuando se utiliza Brij 56 como extractante.

5.2.2.- Efecto sobre los PCDFs

Al igual que para los PCBs, se estudió la influencia de la concentración inicial de analito sobre los porcentajes de recuperación en el mismo intervalo de concentraciones desde 1.0×10^{-7} M a 1.0×10^{-5} M, y en este caso se muestra el comportamiento de algunos de los analitos estudiados (2-CDF, 3-CDF y 4-CDF), siendo su comportamiento representativo de los restantes analitos.

Se ha comprobado que para los surfactantes estudiados, Genapol X-080 y Brij 56, los analitos presentan un comportamiento lineal para todo el intervalo de estudio (Figura 29), pudiendo observarse que las variaciones existentes en los porcentajes de recuperación no pueden considerarse como significativos, y por tanto, el parámetro en estudio no tiene influencia sobre la recuperación. De aquí que la metodología de extracción por punto de nube pueda aplicarse independientemente de la concentración inicial de PCDFs en la muestras.

a) Genapol X-080

b) Brij 56

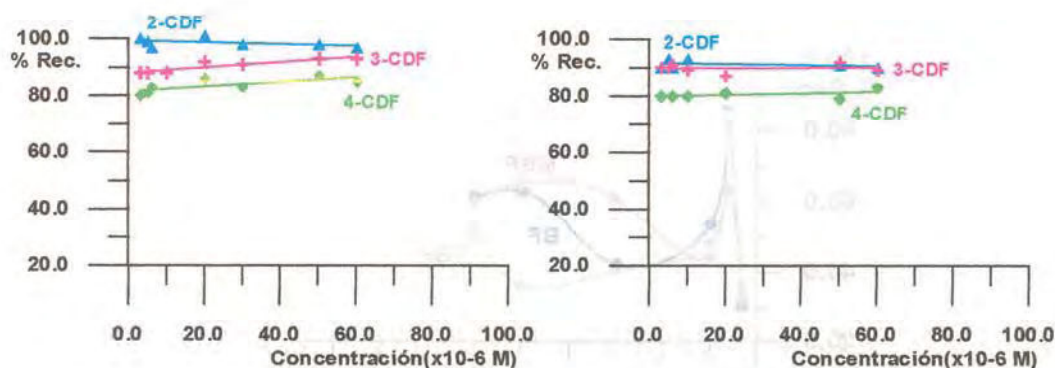


Figura 29.- Efecto de la concentración inicial de PCDFs en disolución sobre los porcentajes de recuperación.

Si comparamos los resultados obtenidos en este estudio con los correspondientes a los PCBs, se observa que para el caso del Brij 56 la influencia de esta variable es completamente diferente. Este comportamiento puede ser debido a las diferentes estructuras y propiedades, tanto de los analitos como del propio surfactante.

5.3.- Efecto de la concentración de surfactante en los porcentajes de recuperación

Al igual que la concentración inicial de analito en disolución, la concentración de surfactante que se utilice para la extracción y preconcentración de los mismos, puede ser un factor importante del proceso. Las porcentajes de recuperación pueden verse alterados por este parámetro, y por tanto, es necesario realizar un estudio sobre el mismo. Para este estudio, se establecieron tres concentraciones diferentes de 1, 2 y 3 % (p/v).

5.3.1.- Efecto sobre los PCBs

Del mismo modo que para el estudio anterior, como ejemplo, se muestran los resultados obtenidos para tres de los siete PCBs estudiados, considerándose éstos representativos de todos los demás.

Para este estudio se ha utilizado el mismo intervalo de concentraciones de analito que en el estudio precedente. Cuando se representan los porcentajes de recuperación frente a la variación de la concentración de Genapol X-080, Brij 30 o Brij 97, no se observan variaciones significativas en los porcentajes de recuperación para los distintos PCBs (Figura 30-A, 30-B y 30-C, respectivamente), en ninguno de los casos estudiados. Por tanto, podemos suponer que la concentración de surfactante que se utilice en el proceso de extracción y preconcentración de los PCBs, no tiene influencia siempre que se trabaje con estos medios micelares, y con una concentración de surfactante en disolución superior a la concentración micelar crítica.

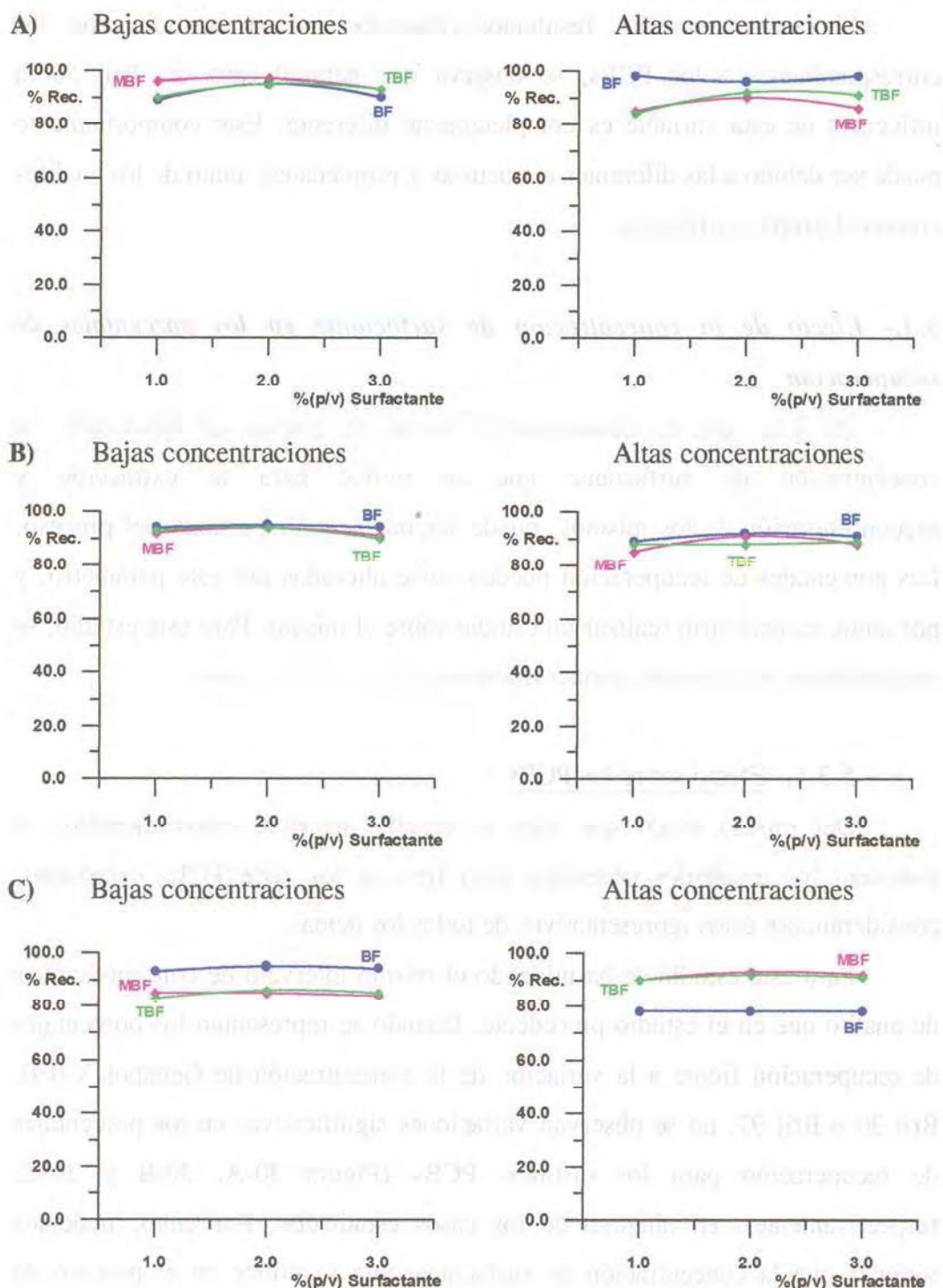


Figura 30.- Efecto de la concentración de surfactante en los porcentajes de recuperación de los PCBs. A) Genapol X-080, B) Brij 30, C) Brij 97

En el caso del Brij 56, la representación gráfica de los resultados obtenidos (Figura 31), nos muestra variaciones de los porcentajes de recuperación al variar la concentración de surfactante en la disolución. Estas variaciones se observan para todos los PCBs, indistintamente de la concentración inicial de los mismos en la muestra a analizar. Estos resultados, similares a los ya obtenidos en el estudio anterior, indican que la eficiencia del Brij 56 como medio extractante, depende, no sólo de la concentración inicial de analito en la disolución, sino también de la concentración de surfactante que se utilice en el proceso de extracción por punto de nube.

a) Bajas concentraciones

b) Altas concentraciones

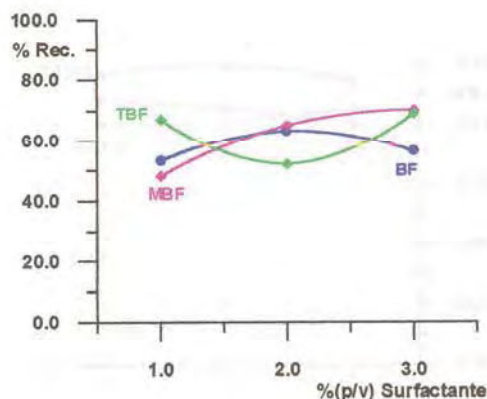
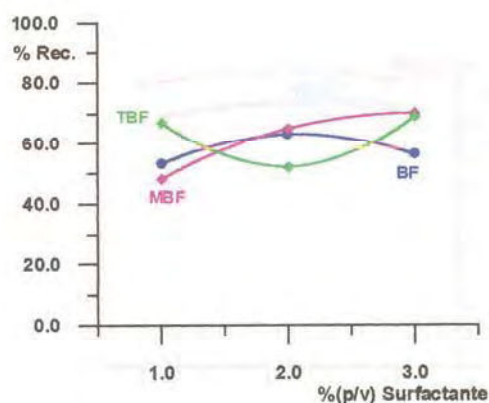


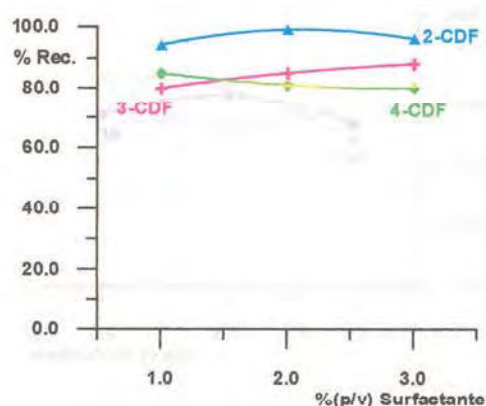
Figura 31.- Influencia de la concentración de Brij 56 en disolución, en los porcentajes de recuperación de los PCBs.

5.3.2.- Influencia en los PCDFs

Del mismo modo que en los estudios realizados anteriormente, las gráficas presentadas en este apartado, mostrarán, a modo de ejemplo, el comportamiento de tres de los analitos como representativos de toda la familia estudiada.

A lo largo del estudio realizado, se han obtenido altos porcentajes de recuperación para todos los analitos, sin observarse variaciones significativas de los mismos para ninguno de los analitos estudiados. El comportamiento presentado por los diferentes PCDFs, es similar para los dos surfactantes estudiados, Genapol X-080 (Figura 32) y Brij 56 (Figura 33), lo cual nos lleva a la conclusión de que la variación que se produzca en la concentración de surfactante de la disolución utilizada como extractante, no produce variaciones en los porcentajes de recuperación. Por tanto, este parámetro no es un factor influyente en el proceso de extracción por punto de nube, siempre que se analicen estos compuestos.

a) Bajas concentraciones



b) Altas concentraciones

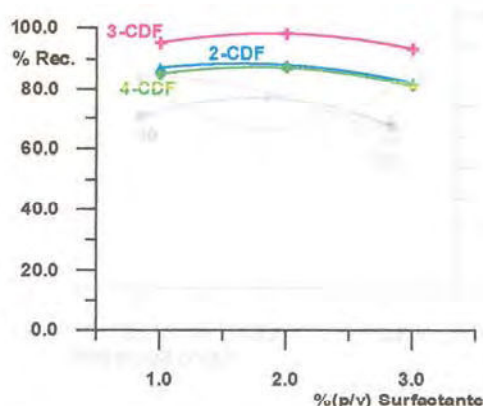


Figura 32.- Efecto de la concentración de Genapol X-080 sobre los porcentajes de recuperación de los PCDFs.

a) Bajas concentraciones

b) Altas concentraciones

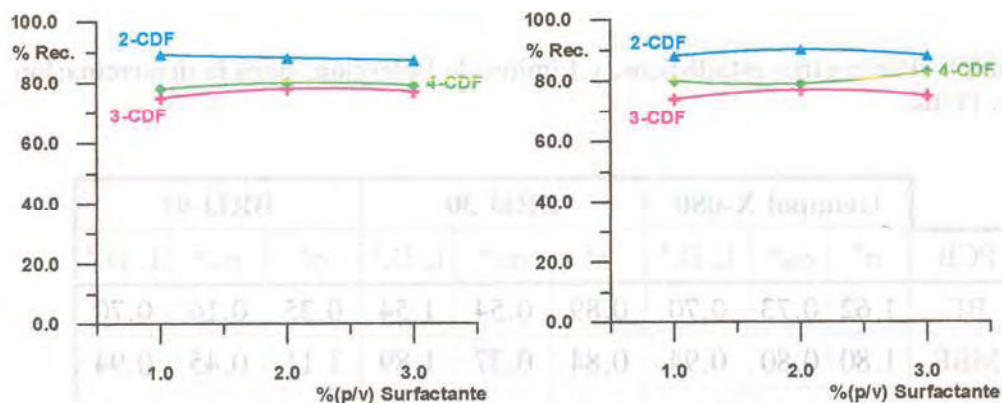


Figura 33.- Efecto de la concentración de Brij 56 sobre los porcentajes de recuperación de los PCDFs.

5.4.- Evaluación estadística del método

Para el estudio estadístico de la precisión y exactitud de los diversos métodos propuestos para la extracción, preconcentración y determinación de los PCBs y PCDFs presentes en medios acuosos, se prepararon seis muestras con una concentración de analito correspondiente al intervalo de concentraciones previamente establecido para cada caso.

El estudio estadístico se realizó para tres de los cuatro surfactantes con los cuales se realizaron los estudios, Genapol X-080, Brij 30 y Brij 97, puesto que uno de ellos, el Brij 56, no presentaba buenos resultados en cuanto a los porcentajes de recuperación. Los parámetros estadísticos calculados para estos surfactantes se muestran en la Tabla XX. Junto a estos valores se presentan los Límites de Detección. Estos límites de detección se calcularon para las diferentes condiciones estudiadas, teniendo en cuenta la cantidad de analito que

producía un pico cuya altura es múltiplo de la altura de la línea base, o ruido de fondo [138].

Tabla XX- Parámetros estadísticos, y Límites de Detección, para la determinación de los PCBs.

PCB	Genapol X-080			BRIJ 30			BRIJ 97		
	$\sigma^{\#}$	σ_m^*	L.D. [‡]	$\sigma^{\#}$	σ_m^*	L.D. [‡]	$\sigma^{\#}$	σ_m^*	L.D. [‡]
BF	1.62	0.73	0.70	0.89	0.54	1.54	0.35	0.16	0.70
MBF	1.80	0.80	0.94	0.84	0.37	1.89	1.11	0.45	0.94
DBF	0.89	0.40	0.70	0.65	0.27	2.23	1.26	0.52	1.10
TriBF	1.36	0.60	12.80	1.03	0.42	7.71	0.67	0.27	2.57
TBF	1.07	0.48	1.46	1.21	0.49	2.92	1.61	0.66	2.92
PBF	0.82	0.33	3.20	0.89	0.36	16.30	1.3	0.58	16.30
HBF	0.63	0.51	3.61	1.50	0.61	10.82	1.37	0.56	18.04

#: Desviación estandar; *: Desviación estandar media.;

‡: Límite de Detección en ng.ml⁻¹

De la misma forma que para las curvas de calibrado, al estudiarse la reproducibilidad de los métodos para la determinación de los PCDFs, se ha obtenido un único dato para cada uno de estos parámetros, puesto que se ha podido observar que el comportamiento que presentan estos analitos es el mismo, independientemente del surfactante utilizado. Estos valores se muestran, junto con los Límites de Detección en la Tabla XXI.

Tabla XXI.- Parámetros estadísticos, y Límites de Detección, para la determinación de los PCDFs .

	DBF ₀	1-CDF	2-CDF	3-CDF	4-CDF	5-CDF
$\sigma^{\#}$	0.022	0.457	0.037	0.293	0.096	0.175
σ_m^{*}	0.009	0.204	0.016	0.131	0.043	0.087
L.D. [‡]	0.50	17.60	13.30	4.90	0.70	27.50

[#]: Desviación estandar; ^{*}: Desviación estandar media.; [‡]: Límite de Detección en ng.ml⁻¹

5.5.- Porcentajes de recuperación

Los resultados obtenidos durante los diferentes estudios realizados, hasta alcanzar las condiciones óptimas se han comprobado aplicando la metodología a distintas muestras con diferentes concentraciones de analitos. Los porcentajes de recuperación obtenidos para los diferentes PCBs en estudio, al aplicar las condiciones establecidas se muestran en las Tablas XXII y XXIII. En estas tablas se muestran los porcentajes obtenidos para ambos intervalos de concentración estudiados.

En los resultados puede observarse que los porcentajes de recuperación obtenidos cuando se usa Genapol X-080 como extractante son más que aceptables, varían en un intervalo comprendido entre el 82 y 99%. Del mismo modo, los resultados obtenidos con el Brij 30 varían entre el 76 y el 96%, y para el Brij 97 entre 82 y 98%. Por el contrario, cuando el medio micelar utilizado es el Brij 56, los porcentajes de recuperación que se obtienen son mucho menores, encontrándose en un intervalo que oscila entre el 50 y el 85%.

Con todo esto, podemos indicar que la extracción y preconcentración de PCBs presentes en medios acuosos puede llevarse a cabo mediante la utilización de la metodología de extracción por punto de nube de forma muy efectiva.

Tabla XXII.- Resultados obtenidos en la extracción y preconcentración de los PCBs tras aplicar la metodología de “punto de nube”, utilizando las condiciones establecidas para el rango de concentraciones bajas.

Analito	Genapol X-080			Brij 56			Brij 30			Brij 97		
	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.
BF	77.1	76.3	99.0	77.1	65.5	85.0	77.1	73.2	94.9	77.1	73.2	94.9
MBF	94	81.8	87.0	94	66.7	71.0	94	90.2	96.0	94	79.9	85.0
DBF	111.5	101.5	91.0	111.5	55.8	50.0	111.5	108.1	97.0	111.5	105.9	95.0
TriBF	128.8	122.4	95.0	128.8	73.4	57.0	128.8	105.6	82.0	128.8	123.6	96.0
TBF	146	140.2	96.0	146	119.1	81.6	146	127	87.0	146	125.6	86.0
PBF	163.2	156.7	96.0	163.2	117.5	72.0	163.2	143.6	88.0	163.2	150.1	92.0
HBF	180.5	166	92.0	180.5	122.9	68.1	180.5	171.5	95.0	180.5	171.5	95.0

* Referido a la concentración inicial de analito en disolución.

Tabla XXIII.- Resultados obtenidos en la extracción y preconcentración de los PCBs tras aplicar la metodología de “punto de nube”, utilizando las condiciones establecidas, para el rango de concentraciones altas.

Analito	Genapol X-080			Brij 56			Brij 30			Brij 97		
	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.
BF	771	740	96.0	771	655	85.0	771	709	92.0	771	601	78.0
MBF	940	855	91.0	940	611	65.0	940	865	92.0	940	874	93.0
DBF	1115	1000	90.0	1115	847	76.0	1115	1037	93.0	1115	925	83.0
TriBF	1288	1056	82.0	1288	837	65.0	1288	1236	96.0	1288	1121	87.0
TBF	1460	1343	92.0	1460	730	50.0	1460	1285	88.0	1460	1343	92.0
PBF	1632	1378.2	85.0	1632	1061	65.0	1632	1599	98.0	1632	1387	85.0
HBF	1714	1628.3	95.0	1714	1176	65.0	1714	1662	97.0	1714	1303	76.0

* Referido a la concentración inicial de analito en disolución.

Para el análisis de los PCDFs, presentes en medios acuosos, mediante la metodología establecida, se obtienen resultados muy satisfactorios cuando se utiliza Genapol X-080 y Brij 56. Para el caso del Genapol X-080 los porcentajes de recuperación oscilan entre un 96 y el 100%, mientras que para el Brij 56, los porcentajes de recuperación varían en el intervalo 89-99%. Los resultados obtenidos para los diversos analitos en estudio se muestran en las Tablas XXIV y XXV.

Tabla XXIV.- Porcentajes de recuperación obtenidos para PCDFs en medio acuoso usando Genapol X-080 y Brij 56, para bajas concentraciones.

Analito	Genapol X-080			Brij 56		
	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.
DBF ₀	84.0	84.0	100.0	84.0	81.6	97.1
1-CDF	101.2	99.2	98.1	101.2	95.1	94.0
2-CDF	118.5	117.3	99.0	118.5	110.2	93.0
3-CDF	135.7	119.4	88.1	135.7	129.9	95.7
4-CDF	153.0	150.9	98.6	153.0	141.8	92.7
5-CDF	170.2	165.1	97.0	170.2	116.7	68.6

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en disolución.

Tabla XXV.- Porcentajes de recuperación obtenidos para PCDFs usando Genapol X-080 y Brij 56, para altas concentraciones.

Analito	Genapol X-080			Brij 56		
	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.
DBF _o	840	816	96.0	840	773	92.0
1-CDF	1012	982	97.0	1012	931	92.0
2-CDF	1185	1161	98.0	1185	1077	90.0
3-CDF	1357	1262	93.0	1357	1299	95.0
4-CDF	1530	1356	88.0	1530	1515	99.0
5-CDF	1702	1685	99.0	1702	1515	89.0

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en disolución.

6.- Aplicaciones del proceso de extracción por Punto de Nube a muestras reales.

La presencia de compuestos organoclorados, como PCBs y PCDFs, en el medio marino es bien conocido. Como se mencionó previamente, estos compuestos son altamente tóxicos teniendo gran repercusión sobre los organismos presentes en el medio. Al presentar baja solubilidad en agua, tienden a adsorberse en los materiales particulados, los cuales pasan a formar parte de los sedimentos, o son consumidos por los organismos, incorporándose de esta forma a la cadena trófica. Como consecuencia de esta característica, la concentración de los mismos en agua de mar es reducida, siendo necesaria la optimización de nuevas metodologías que nos permitan una buena extracción y determinación de los mismos.

Tras optimizar la metodología de extracción y preconcentración por punto de nube, tanto para la familia de los PCBs como la familia de los PCDFs, la misma se ha aplicado a muestras reales de agua de mar procedentes de diferentes áreas costeras españolas. Principalmente se han utilizado muestras de agua de mar del litoral de la isla de Gran Canaria (Islas Canarias), y para comprobar la aplicabilidad generalizada del mismo, se ha realizado un estudio con agua de mar procedente de la costa del País Vasco.

En la Figura 34 se muestra a modo de ejemplo, un cromatograma obtenido para la determinación de los PCBs por HPLC y detección por fluorescencia tras aplicar la metodología de punto de nube a las muestras de agua de mar reales.

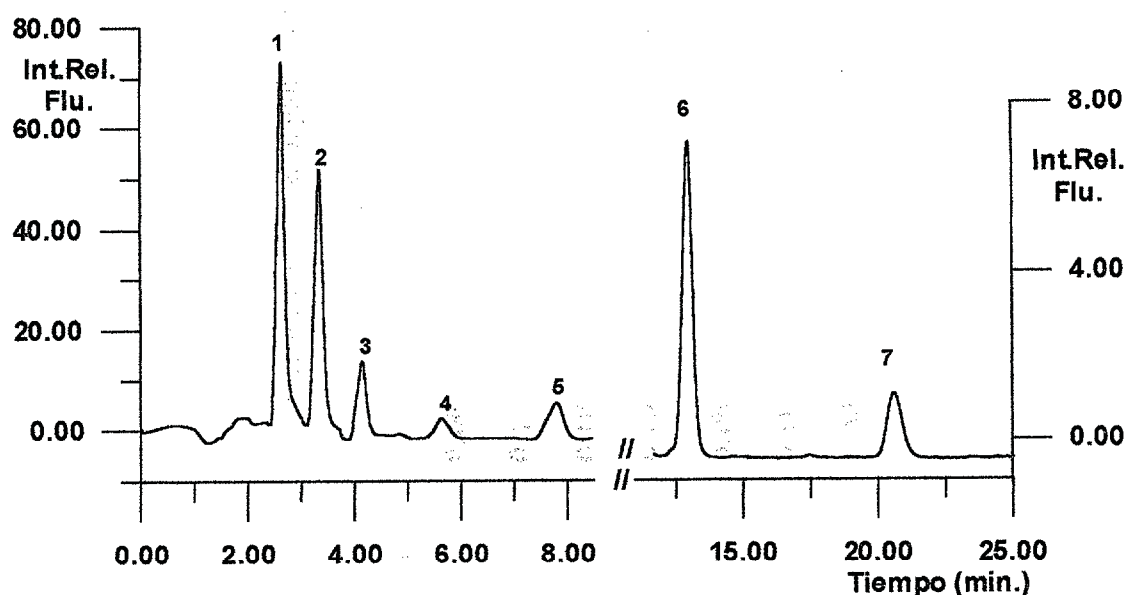


Figura 34- Cromatograma obtenido tras la extracción por Punto de Nube de siete PCBs presentes en una muestra de agua de mar procedente del puerto de "Agaete" (Gran Canaria).

1.- BF; 2.- MBF; 3.- DBF; 4.- TriBF; 5.- TBF; 6.- PBF; 7.- HBF

Los resultados obtenidos para las diferentes muestras, una vez acondicionadas según el procedimiento descrito en la Parte Experimental, se encuentran agrupados en las Tablas XXVI, XXVII, XXVIII, XXIX y XXX. Como se observa en las mismas, se obtienen altos porcentajes de recuperación para todos los analitos presentes, lo que muestra la alta aplicabilidad del método propuesto.

Tabla XXVI.- Aplicación de la extracción y preconcentración de PCBs en muestras de agua de mar, mediante la metodología de punto de nube, utilizando el Genapol X-080 como medio micelar.

a) Arinaga (SE Gran Canaria)

PCB	Añad. ng.ml ⁻¹	Encon.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Encon.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Encon.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Encon.* ng.ml ⁻¹	% Rec.
BF	77.1	70.1	90.9	123.4	116.1	94.1	0.46	0.42	91.3	0.92	0.8	87.0
MBF	94.3	85.8	91.0	151	130	86.1	0.57	0.59	103.5	1.13	1.1	97.3
DBF	111.5	101.5	91.0	178.5	179	100.3	0.67	0.6	89.6	1.34	1.24	92.5
TriBF	128.8	112.1	87.0	206.1	193.7	94.0	0.77	0.73	94.8	1.45	1.29	89.0
TBF	146	125.6	86.0	233.6	219.6	94.0	0.88	0.53	60.2	1.75	1.63	93.1
PBF	163.2	150.1	92.0	261.1	245.4	94.0	0.98	0.91	92.9	1.96	1.86	94.9
MBF	180.5	173.3	96.0	288.7	259.8	90.0	1.08	0.96	88.9	2.16	1.97	91.2

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en disolución

b) Elantxobe (País Vasco)

PCB	Añad. ng.ml ⁻¹	Encon.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Encon.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Encon.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Encon.* ng.ml ⁻¹	% Rec.
BF	77.1	66.5	86.3	123.4	101.2	82.0	0.46	0.39	84.8	0.92	0.82	89.1
MBF	94.3	95.2	101.0	151	137.8	91.3	0.57	0.52	91.2	1.13	1.1	97.3
DBF	111.5	110.4	99.0	178.5	176.3	98.8	0.67	0.61	91.0	1.34	1.26	94.0
TriBF	128.8	123.78	96.1	206.1	197.9	96.0	0.77	0.76	98.7	1.45	1.48	102.1
TBF	146	121.2	83.0	233.6	194.1	83.1	0.88	0.75	85.2	1.75	1.52	86.9
PBF	163.2	153.6	94.1	261.1	242.8	93.0	0.98	0.95	96.9	1.96	1.88	95.9
HBF	180.5	166.4	92.2	288.7	271.6	94.1	1.08	1	92.6	2.16	2.12	98.1

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en disolución

Tabla XXVII.- Aplicación de la extracción y preconcentración de PCBs en muestras de agua de mar, mediante la metodología de punto de nube, utilizando el Brij 30 como medio micelar.

a) Arinaga (SE Gran Canaria)

PCB	Añad. ng.ml ⁻¹	Encon.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Encon.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. μg.ml ⁻¹	Encon.* μg.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. μg.ml ⁻¹	Encon.* μg.ml ⁻¹	% Rec.
BF	46.0	40.0	87.0	92.0	81.0	88.0	0.46	0.40	87.0	0.92	0.84	91.3
MBF	57.0	57.5	100.9	113.0	105.1	93.01	0.57	0.53	93.0	1.13	0.99	87.6
DBF	67.0	62.3	93.0	134.0	111.2	83.0	0.67	0.61	91.0	1.34	1.38	103.0
TriBF	77.0	76.0	98.7	145.0	131.9	91.0	0.77	0.60	77.9	1.45	1.30	89.7
TBF	88.0	73.0	83.0	175.0	157.5	90.0	0.88	0.90	102.3	1.75	1.70	97.1
PBF	98.0	93.0	94.9	196.0	184.2	94.0	0.98	0.89	90.8	1.96	1.57	80.1
HBF	108.0	94.0	87.0	216.0	179.3	83.0	1.08	1.06	98.1	2.16	2.03	94.0

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en disolución.

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en disolución.

PCB	Añad. ng.ml ⁻¹	Encon.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Encon.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. μg.ml ⁻¹	Encon.* μg.ml ⁻¹	% Rec.
BF	46.0	41.1	89.3	92.0	73.6	80.2	0.46	0.38	82.6
MBF	57.0	51.9	91.1	113.0	106.2	93.8	0.57	0.60	105.3
DBF	67.0	61.6	91.9	134.0	130.0	97.0	0.67	0.69	103.0
TriBF	77.0	64.0	83.1	145.0	114.5	79.0	0.77	0.75	97.4
TBF	88.0	93.3	106.0	175.0	159.2	91.0	0.88	0.82	93.2
PBF	98.0	94.1	96.0	196.0	174.4	89.0	0.98	0.90	91.8
HBF	108.0	86.4	80.0	216.0	220.3	101.9	1.08	0.90	83.3

Tabla XXVIII.- Aplicación de la extracción y preconcentración de PCBs en muestras de agua de mar, mediante la metodología de punto de nube, utilizando el Brij 97 como medio micelar.

a) Arinaga (SE Gran Canaria)

PCB	Añad. ng.ml ⁻¹	Encon.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Encon.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. μg.ml ⁻¹	Encon.* μg.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. μg.ml ⁻¹	Encon.* μg.ml ⁻¹	% Rec.
BFB	46.0	42.3	92.0	92	75.4	82.0	0.46	0.37	80.4	0.92	0.85	92.4
MIBF	57.0	53.6	93.9	113	108.5	96.2	0.57	0.52	91.2	1.13	0.93	82.3
DBF	67.0	55.6	83.0	134	123.3	92.0	0.67	0.54	80.6	1.34	1.41	105.2
TriBF	77.0	64.7	84.0	145	119.0	82.1	0.77	0.61	79.2	1.45	1.30	89.7
TBF	88.0	82.0	93.5	175	166.2	95.0	0.88	0.74	84.1	1.75	1.50	85.7
PBF	98.0	93.1	94.9	196	205.8	104.8	0.98	1.02	104.1	1.96	1.80	91.8
HBF	108.0	94.0	87.0	216	218.2	100.9	1.08	1.10	101.9	2.16	1.88	87.0

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en disolución.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

b) Agaete (NO Gran Canaria)

PCB	Añad. ng.ml ⁻¹	Encon.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Encon.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. μg.ml ⁻¹	Encon.* μg.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. μg.ml ⁻¹	Encon.* μg.ml ⁻¹	% Rec.
BF	46.0	46.9	101.1	92.0	82.8	90.0	0.46	0.38	82.6	0.92	0.87	94.6
MBF	57.0	51.3	90.0	113.0	105.1	93.0	0.57	0.51	89.5	1.13	1.16	102.7
DBF	67.0	71.0	105.2	134.0	116.6	87.2	0.67	0.70	104.5	1.34	1.15	85.8
TriBF	77.0	77.0	100.0	145.0	130.5	89.8	0.77	0.79	102.6	1.45	1.39	95.9
TBF	88.0	70.4	80.3	175.0	145.2	83.0	0.88	0.79	89.8	1.75	1.71	97.7
PBF	98.0	87.2	89.5	196.0	151.0	77.2	0.98	0.81	82.7	1.96	1.84	93.9
HB	108.0	102.6	94.7	216.0	200.9	93.1	1.08	0.94	87.0	2.16	1.94	89.8

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en disolución.

Tabla XXIX.- Aplicación de la extracción y preconcentración de PCDFs en muestras de agua de mar, mediante la metodología de punto de nube, siendo el Genapol X-080 el medio micelar utilizado.

a) Arinaga (SE Gran Canaria)

PCDFs	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.
DBF ₀	84.0	84.8	100.4	840	764.4	91.0
1-CDF	101.2	105.2	103.8	1012	921.0	91.0
2-CDF	118.5	117.3	98.6	1185	1149.4	97.0
3-CDF	135.7	133.0	98.0	1357	1262.0	93.0
4-CDF	153.0	148.4	97.1	1530	1591.2	104.0
5-CDF	170.2	161.7	95.0	1702	1489.0	87.5

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en disolución

b) Elantxobe (País Vasco)

PCDFs	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Encon.* ng.ml ⁻¹	% Rec.
DBF ₀	84.0	87.3	103.3	840	806.4	96.0
1-CDF	101.2	89.0	87.9	1012	971.5	96.0
2-CDF	118.5	111.4	94.0	1185	1161.3	98.0
3-CDF	135.7	124.8	92.0	1357	1357.0	100.0
4-CDF	153.0	145.3	95.2	1530	1606.5	105.0
5-CDF	170.2	161.7	95.0	1702	1719.0	101.0

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en disolución

c) Agaete (NO Gran Canaria)

PCDFs	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.
DBFo	84.0	83.2	99	840	789.6	94
1-CDF	101.2	91.1	90	1012	931.1	92
2-CDF	118.5	104.3	88	1185	1054.6	89
3-CDF	135.7	127.6	94	1357	1302.7	96
4-CDF	153.0	142.3	93	1530	1468.8	96
5-CDF	170.2	163.4	96	1702	1615.0	95

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en disolución.

Tabla XXX.- Aplicación de la extracción y preconcentración de PCDFs en muestras de agua de mar, mediante la metodología de punto de nube, utilizando Brij 56 como medio micelar.

a) Arinaga (SE Gran Canaria)

PCDFs	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.
DBFo	84.0	79.8	95.0	840.0	756.0	90.0
1-CDF	101.2	89.0	87.9	1012.0	961.4	95.0
2-CDF	118.5	107.8	91.1	1185.0	1208.7	102.0
3-CDF	135.7	123.5	91.2	1357.0	1411.3	104.0
4-CDF	153.0	146.9	96.1	1530.0	1407.6	92.0
5-CDF	170.2	127.6	75.0	1702.0	1582.9	93.0

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en disolución.

b) Elantxobe (País Vasco)

PCDFs	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.
DBF ₀	84.0	83.2	99.4	840.0	756.0	90.0
1-CDF	101.2	99.2	98.0	1012.0	961.4	95.0
2-CDF	118.5	106.6	90.0	1185.0	1196.8	101.0
3-CDF	135.7	119.4	88.1	1357.0	1411.3	104.0
4-CDF	153.0	139.2	91.0	1530.0	1560.6	102.0
5-CDF	170.2	119.1	70.3	1702.0	1668.0	98.0

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en disolución.

b) Agaete (NO Gran Canaria)

PCDFs	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	Rec. %	Añadi.* ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.
DBF ₀	84.0	77.3	92.0	840.0	789.6	94.0
1-CDF	101.2	95.1	94.5	1012.0	991.7	98.0
2-CDF	118.5	117.3	99.2	1185.0	1102.0	93.0
3-CDF	135.7	133.0	98.1	1357.0	1262.0	93.0
4-CDF	153.0	137.7	90.0	1530.0	1514.7	99.0
5-CDF	170.2	115.7	68.2	1702.0	1565.8	92.0

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en disolución.

7.- Optimización del proceso de extracción por Microondas

En todo proceso intervienen diversos parámetros, que pueden influir sobre el mismo en mayor o menor grado. Cuando se utiliza la metodología de extracción asistida por microondas (MAE), los factores principales que deben tenerse en cuenta a la hora de optimizar dicho método, son aquellos que pueden presentar influencia no sólo sobre los analitos en estudio, sino también sobre la muestra sólida, sedimento en nuestro caso, en el que se encuentran. Estos parámetros afectarán principalmente a las interacciones establecidas entre los analitos y el sedimento, así como las interacciones que se producirán entre los analitos y el sedimento, con el medio micelar.

Los factores que se han estudiado en este trabajo son: el pH de la disolución extractante, la concentración de surfactante, la potencia bajo la cual se produce la extracción, y el tiempo del proceso.

La optimización de la metodología MAE se ha llevado a cabo tomándose como matriz muestras de sedimentos marinos procedentes de la playa de "Las Canteras", situada en el NE de la isla de Gran Canaria (Islas Canarias). Este sedimento es arenoso, de textura gruesa y con un alto contenido en componentes calcáreos.

7.1.- Efecto del pH de la disolución

Cuando se analizan sedimentos o muestras sólidas, debe tenerse en cuenta el pH de la disolución extractante, puesto que ésta puede no sólo afectar a los analitos alterando su forma iónica, sino que también puede afectar a los procesos que tienen lugar en el sedimento o muestra sólida.

Los analitos estudiados, tanto PCBs como PCDFs no presentan forma iónica, luego este parámetro no influirá sobre los mismos, pero deberá ser tenido en cuenta puesto que puede influir sobre las interacciones analito-sedimento y analito-medio micelar.

Para estudiar el efecto que produce este parámetro, se ha realizado el proceso de MAE para disoluciones que contienen el surfactante, a dos pH diferentes, un pH=3 (condiciones normales de la disolución) y un pH=11 (logrado mediante la adición de NaOH a la disolución). Para ello, muestras que contenían un gramo de sedimento se trataron con estas disoluciones, aplicándose la metodología a 60 y 70% de potencia del microondas.

7.1.1.- Efecto en la extracción de PCBs

Los resultados obtenidos para el caso de estos analitos, indican que el pH de la disolución extractante no tiene influencia sobre el proceso de extracción, puesto que no se observan variaciones significativas en los porcentajes de recuperación. Algunos ejemplos se muestran en la Tabla XXXI.

Tabla XXXI.- Efecto del pH de la disolución sobre el porcentaje de recuperación en el proceso de extracción de PCBs.

	POLE				GENAPOL X-080			
	60 %		70 %		60 %		70 %	
	pH=3	pH=11	pH=3	pH=11	pH=3	pH=11	pH=3	pH=11
BF	60	55	50	60	37	38	34	32
MBF	68	60	60	65	65	66	55	67
PBF	75	77	75	70	70	65	62	70
HBF	80	80	82	81	73	74	65	70

7.1.2.- Efecto en la extracción de PCDFs

Al igual que para los PCBs, los porcentajes de recuperación obtenidos para los distintos analitos, tras someterlos a diferentes condiciones de pH de la

disolución extractante, no muestran un efecto notorio de este parámetro sobre el proceso de extracción (Tabla XXXII).

Tabla XXXII. Influencia del pH de la disolución extractante sobre la recuperación de PCDFs.

	POLE				GENAPOL X-080			
	60 %		70 %		60 %		70 %	
	pH=3	pH=11	pH=3	pH=11	pH=3	pH=11	pH=3	pH=11
2-CDF	45	37	30	28	32	26	14	15
3-CDF	68	62	45	28	45	38	24	25
4-CDF	70	66	50	50	60	55	45	38

En ambos casos, las variaciones existentes entre los resultados obtenidos no son significativos en cuanto a trabajar con uno u otro pH, pero se observan pequeñas variaciones entre los valores obtenidos a distinta potencia de extracción para un mismo pH, aunque no son excesivamente elevadas. Estas variaciones se observan principalmente en los analitos de menor peso molecular, pudiendo deberse a que a altas potencias, estos compuestos presentan mayor volatilidad.

Por tanto, tras comprobar que el pH no influye en ninguno de los dos casos, se utilizará una disolución con pH ácido, puesto que es la que presenta la disolución de surfactante en las condiciones normales de preparación.

7.2.- Efecto de la concentración de surfactante en disolución

Dependiendo de la concentración de surfactante en disolución, habrá mayor o menor número de micelas que interactuen con los analitos presentes en el sedimento, pudiendo, por tanto, ser un factor importante.

Para establecer la concentración óptima de surfactante en la disolución se estudiaron dos concentraciones diferentes, superiores a la concentración micelar crítica: 0.02 y 0.1 M, que corresponden aproximadamente a un 1.5% (p/v) y un 6% (p/v), respectivamente.

7.2.1.- Influencia sobre la extracción de PCBs

Tanto para el caso en el que se utiliza POLE, como para el caso del Genapol X-080, las variaciones experimentadas en los porcentajes de recuperación son pequeñas (Tabla XXXIII), y no puede decirse que exista una mejora en los mismos al utilizar una u otra concentración. Por tanto, se considera la concentración más reducida, 0.02 M, como la óptima de trabajo, puesto que es la que menor cantidad de surfactante requiere, obteniéndose los mismos porcentajes de recuperación.

Tabla XXXIII.- Porcentajes de recuperación para los PCBs en presencia de POLE y Genapol X-080 para dos concentraciones diferentes de surfactante.

Analito	POLE		Analito	Genapol X-080	
	0.02 M	0.1 M		0.02 M	0.1 M
TriBF	45	41	BF	20	17
TBF	65	65	TriBF	43	44
PBF	86	82	TBF	68	66
HBf	77	83	HBf	66	70

7.2.2.- Efecto sobre la extracción de PCDFs

Al igual que en el caso de los PCBs, los resultados que se han obtenido al realizar este estudio con los PCDFs nos muestran que los porcentajes de recuperación obtenidos al aplicar el proceso de MAE son independientes de la concentración de surfactante utilizada, siempre que ésta permita la presencia de

micelas en la disolución, para lo cual es necesario que se encuentre por encima de la concentración micelar crítica. Algunos ejemplos de los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XXXIV, siendo los mismos representativos de los obtenidos para los restantes analitos.

Tabla XXXIV.- Influencia de la concentración de surfactante sobre los porcentajes de recuperación de los PCDFs.

Analito	POLE		Genapol X-080	
	0.02 M	0.1 M	0.02 M	0.1 M
1-CDF	55	51	40	30
3-CDF	62	60	48	40
4-CDF	65	60	50	53

7.3.- Efecto de la potencia de extracción

La potencia que se utilice en el microondas a la hora de llevar a cabo el proceso de extracción es un parámetro importante puesto que afecta no solamente a las interacciones entre analito-sedimento, sino también a las interacciones que se establecen entre analito-micela y sedimento-micela. Estas interacciones controlan por tanto, los porcentajes de recuperación que se obtendrán tras el proceso.

Pero también hay que tener en cuenta que la temperatura que alcanza la disolución a lo largo del proceso, afectará a los analitos, en función de su mayor o menor volatilidad. Los PCBs y PCDFs son compuestos altamente volátiles a temperaturas superiores a los 70-90°C, luego este será un límite a tener en cuenta. Por tanto, las potencias de extracción que se han elegido para este estudio son: 40, 60 y 80% en el microondas, con objeto de mantener la temperatura de la disolución por debajo del límite mencionado. La potencia de 70%, estudiada junto con la de 60% en el estudio realizado sobre la influencia

del pH, no presentaba grandes diferencias comparado con la potencia de 60 %, por ello no se ha incluido nuevamente en este estudio.

Un parámetro que se ha mantenido constante en este estudio es el tiempo de extracción, es decir, el tiempo que la muestra se mantiene en el microondas. El periodo completo en el microondas se ha dividido en tres pasos diferentes a los que les corresponden, 25, 10 y 10 min. El primer paso, y el más largo de duración, corresponde al periodo de acondicionamiento de la muestra con el medio micelar, mientras que los dos restantes son periodos donde tiene lugar la extracción propiamente dicha.

7.3.1.- Efecto sobre la recuperación de los PCBs

Al llevar a cabo este estudio, se ha observado un comportamiento diferente en el caso de algunos analitos, respecto a los demás, cuando el surfactante utilizado es el POLE. Como puede observarse en las Figuras 35 y 36, existe un comportamiento generalizado para la mayoría de los analitos tanto para la extracción con POLE, como con Genapol X-080. Los analitos presentan altos porcentajes de recuperación para la potencia del 40 %, disminuyendo con posterioridad y volviendo a presentar un aumento de los mismos para la potencia más elevada. Los analitos que presentan un comportamiento diferente son el BF, MBF, DBF y HBF, cuando trabajamos con POLE como medio extractante. Este comportamiento diferente de los tres primeros analitos puede ser debido a su menor peso molecular y mayor volatilidad a altas temperaturas. De aquí que, a medida que aumenta la potencia (aumento en la temperatura), los analitos desaparecen de la muestra, disminuyendo su recuperación. La disminución que tiene lugar para el HBF puede ser debida a problemas estéricos, inherentes a la estructura de la molécula.

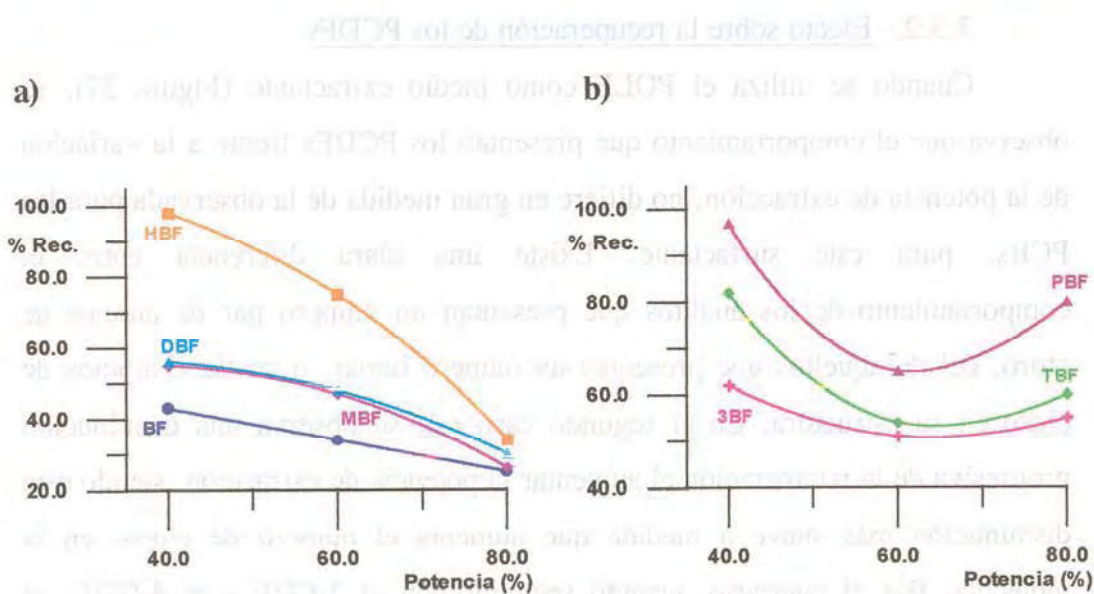


Figura 35.- Porcentajes de recuperación obtenidos para diferentes potencias de extracción, siendo el POLE el extractante.

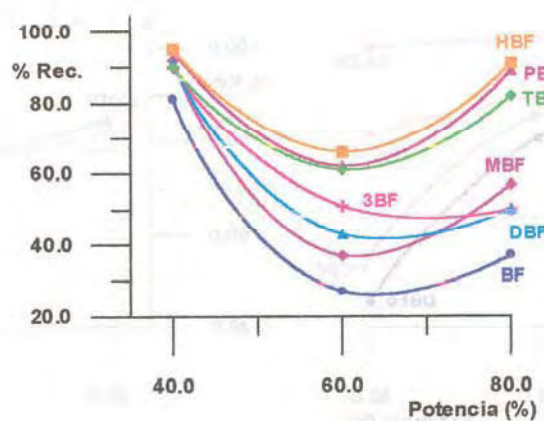


Figura 36.- Efecto de la potencia de extracción sobre los PCBs cuando se usa el Genapol X-080 como extractante.

7.3.2.- Efecto sobre la recuperación de los PCDFs

Cuando se utiliza el POLE como medio extractante (Figura 37), se observa que el comportamiento que presentan los PCDFs frente a la variación de la potencia de extracción, no difiere en gran medida de la observada para los PCBs, para este surfactante. Existe una clara diferencia entre el comportamiento de los analitos que presentan un número par de átomos de cloro, del de aquellos que presentan un número impar, o no tiene átomos de cloro en su estructura. En el segundo caso (a), se observa una disminución progresiva de la recuperación al aumentar la potencia de extracción, siendo esta disminución más suave a medida que aumenta el número de cloros en la molécula. Por el contrario, cuando tratamos con el 2-CDF y el 4-CDF, se observa una ligera disminución en la recuperación al pasar de una potencia de 40 % a una superior de 60 %, manteniéndose posteriormente constante para una potencia de 80 %.

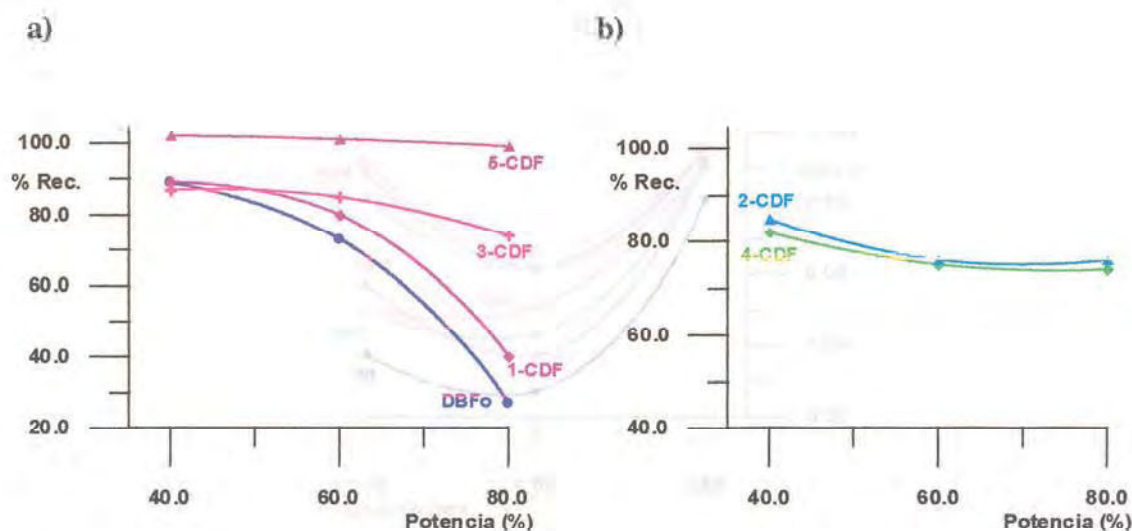


Figura 37.- Efecto de la potencia de extracción sobre los porcentajes de recuperación de los PCDFs en presencia de POLE.

Para el Genapol X-080 (Figura 38), no se observa un comportamiento diferenciado entre los distintos analitos en estudio, sino que todos ellos presentan un comportamiento similar. A diferencia de los PCBs, los PCDFs presentan una disminución progresiva de la recuperación obtenida en el proceso, a medida que aumenta la potencia de extracción. Por otro lado, también puede observarse de forma general, que el grado de disminución es más pequeño a medida que aumenta el peso molecular del compuesto, o dicho de otra forma, aumenta el número de átomos de cloro en la molécula.

Hay que destacar que para altas potencias (80%), el DBFo y el 1-CDF, en presencia de Genapol X-080 no se observaban en la disolución extraída. Esto puede ser debido a una volatilización mayor de estos compuestos en presencia de Genapol X-080 que en presencia de POLE, puesto que incluso este último surfactante, los porcentajes de recuperación de estos analitos son muy reducidos.

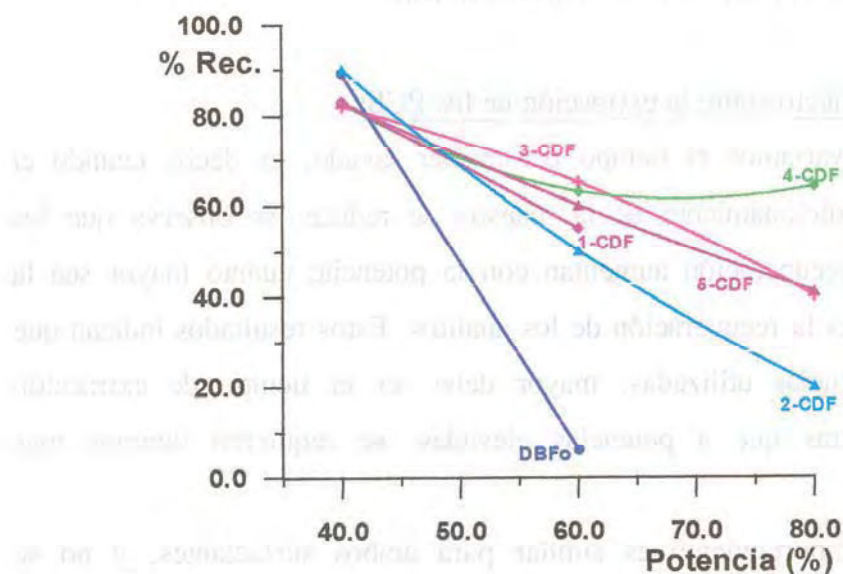


Figura 38.- Influencia de la potencia de extracción en la recuperación de los PCDFs, siendo el Genapol X-080 el extractante.

7.4.- Influencia del tiempo de extracción sobre los porcentajes de recuperación

En el proceso de extracción de muestras sólidas, es necesario realizar una serie de lavados de la muestra para extraer todos los compuestos que se quieren analizar posteriormente. En este caso, se utilizan tres pasos de lavado: un lavado inicial, de mayor duración y en el cual la muestra con los analitos se pone en contacto con el medio extractante (acondicionamiento de la muestra), y dos lavados posteriores, de menor duración.

Al igual que la potencia utilizada, el tiempo que la muestra se mantiene en contacto con el medio extractante influirá en las interacciones y equilibrios que se establezcan, y por tanto, en los porcentajes de recuperación que serán obtenidos tras el proceso.

Para estudiar el efecto que tiene este parámetro en el proceso de extracción por microondas, se realizaron extracciones variando el tiempo del proceso para las tres potencias anteriores. Se ensayaron dos series de tiempos: 25, 10, 10 min. y 15, 10, 10 min. respectivamente.

7.4.1.- Efecto sobre la extracción de los PCBs

Cuando variamos el tiempo del primer lavado, es decir, cuando el tiempo de acondicionamiento de la muestra se reduce, se observa que los porcentajes de recuperación aumentan con la potencia: cuanto mayor sea la potencia mejor es la recuperación de los analitos. Estos resultados indican que a menores potencias utilizadas, mayor debe ser el tiempo de extracción utilizado, mientras que a potencias elevadas, se requieren tiempos más reducidos.

Este comportamiento es similar para ambos surfactantes, y no se observan variaciones en el comportamiento de los diferentes analitos. En las Figuras 39 y 40 se muestran algunos ejemplos de los resultados obtenidos para el POLE y el Genapol X-080 respectivamente.

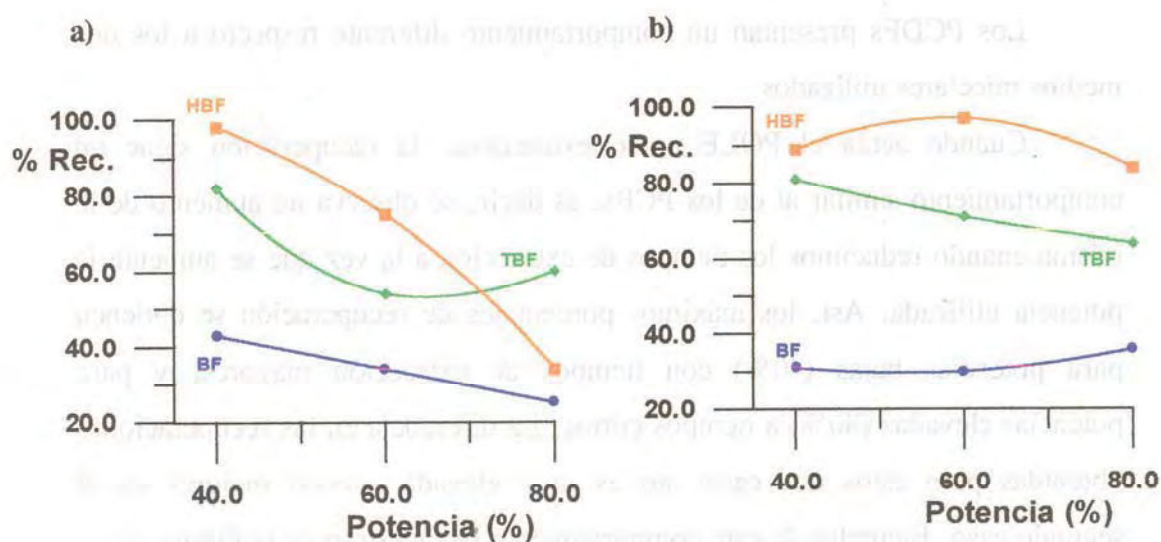


Figura 39.- Efecto de la variación del tiempo de extracción en la recuperación de PCBs utilizando POLE como extractante. (a) extracción con 25, 10, 10 min., (b) extracción con 15, 10, 10 min.

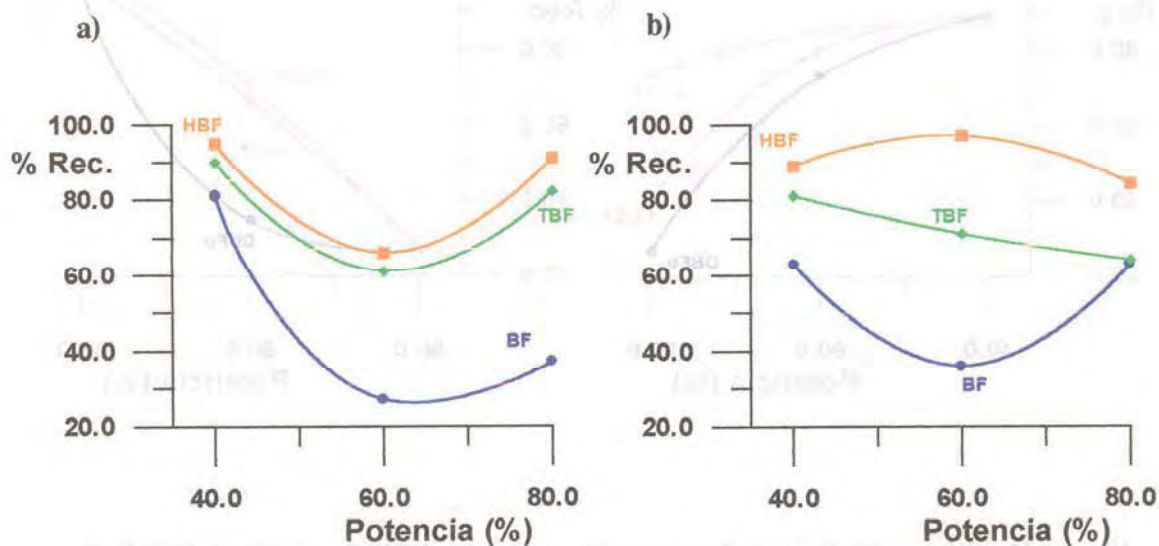


Figura 40.- Ejemplos de la influencia del tiempo de extracción sobre los PCBs en presencia de Genapol X-080. (a) extracción con 25, 10, 10 min., (b) extracción con 15, 10, 10 min.

7.4.2.- Efecto sobre los PCDFs

Los PCDFs presentan un comportamiento diferente respecto a los dos medios micelares utilizados.

Cuando actúa el POLE como extractante, la recuperación sigue un comportamiento similar al de los PCBs, es decir, se observa un aumento de la misma cuando reducimos los tiempos de extracción a la vez que se aumenta la potencia utilizada. Así, los máximos porcentajes de recuperación se obtienen para potencias bajas (40%) con tiempos de extracción mayores, y para potencias elevadas (80%) a tiempos cortos. La diferencia en las recuperaciones obtenidas para estos dos casos no es muy elevada, siendo mejores en el segundo caso. Ejemplos de este comportamiento se muestran en la Figura 41.

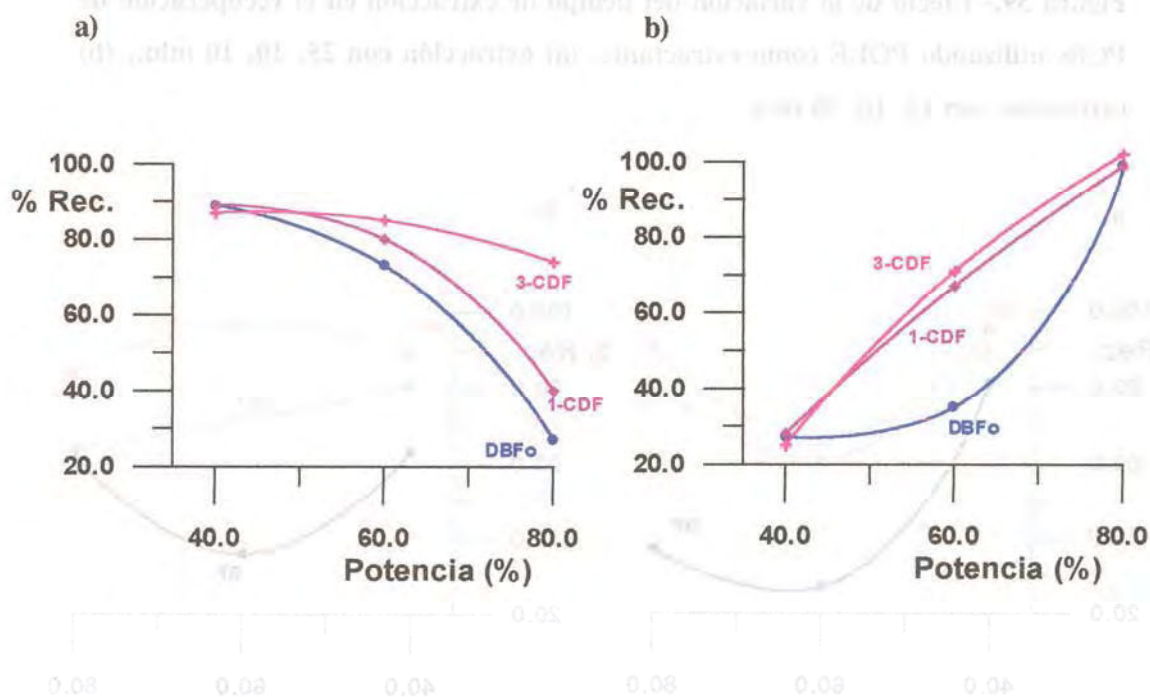


Figura 41.- Efecto del tiempo de extracción sobre los PCDFs, siendo el POLE el extractante. (a) extracción con 25, 10, 10 min., (b) extracción con 15, 10, 10 min.

Para el caso del Genapol X-080, el comportamiento de los analitos es prácticamente similar para las dos condiciones de extracción estudiadas (Figura 42). Como puede observarse, los porcentajes de recuperación disminuyen a medida que aumenta la potencia de extracción, siendo los porcentajes de recuperación muy similares para ambas series de tiempos, aunque ligeramente superiores para tiempos menores de extracción. Por tanto, las condiciones que se establecen son potencias bajas con tiempos de extracción cortos.

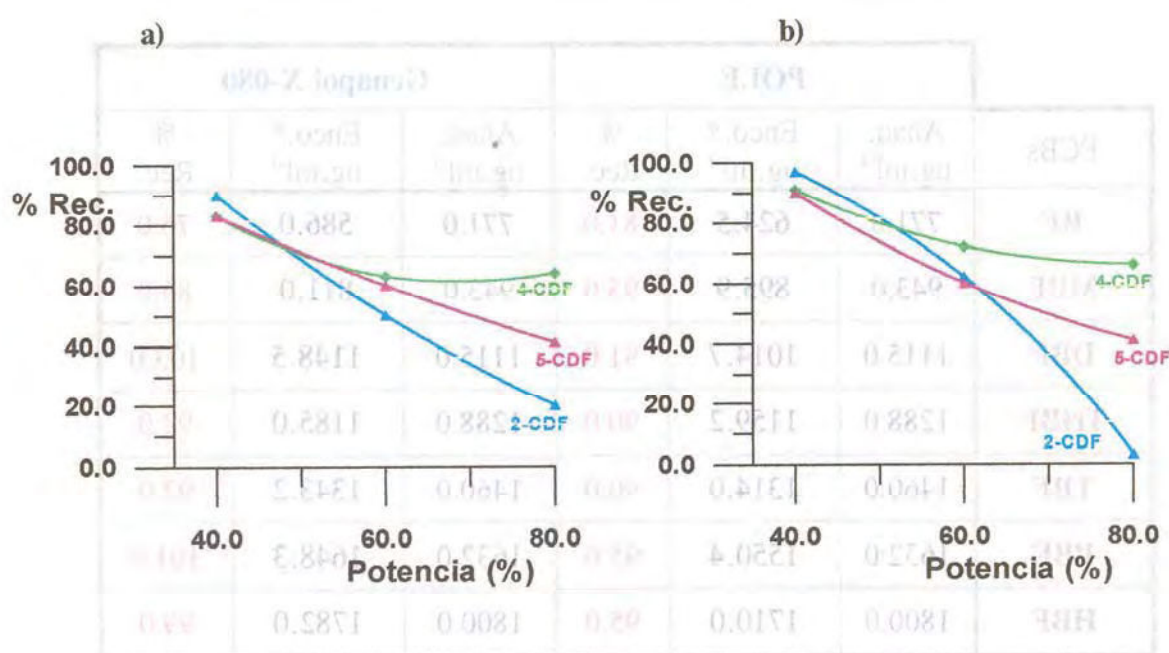


Figura 42.- Influencia del tiempo de extracción sobre los PCDFs en presencia de Genapol X-080. (a) extracción con 25, 10, 10 min., (b) extracción con 15, 10, 10 min.

7.5.- Porcentajes de recuperación

Tras optimizar las condiciones del método de extracción por microondas, diferentes muestras fueron sometidas al mismo, para comprobar los resultados previamente obtenidos. Los porcentajes de recuperación

obtenidos para los diversos analitos en estudio, tanto PCBs como PCDFs, se muestran en las Tablas XXXV y XXXVI, respectivamente.

Como puede observarse, los porcentajes de recuperación obtenidos son muy satisfactorios para todos los analitos estudiados, independientemente del surfactante utilizado.

Tabla XXXV.- Porcentajes de recuperación obtenidos para los PCBs en un sedimento marino, tras aplicar el proceso de extracción por microondas.

PCBs	POLE			Genapol X-080		
	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.
BF	771.0	624.5	81.0	771.0	586.0	76.0
MBF	943.0	895.9	95.0	943.0	811.0	86.0
DBF	1115.0	1014.7	91.0	1115.0	1148.5	103.0
TriBF	1288.0	1159.2	90.0	1288.0	1185.0	92.0
TBF	1460.0	1314.0	90.0	1460.0	1343.2	92.0
PBF	1632.0	1550.4	95.0	1632.0	1648.3	101.0
HBf	1800.0	1710.0	95.0	1800.0	1782.0	99.0

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en el sedimento.

Tabla XXXVI.- Porcentajes de recuperación para los PCDFs en un sedimento marino, tras aplicar el proceso de extracción asistido por microondas.

PCDFs	POLE			Genapol X-080		
	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añadido* ng.ml ⁻¹	Encontra.* ng.ml ⁻¹	% Rec.
DBFo	840.0	831.6	99.0	840.0	789.6	94.0
1-CDF	1012.0	1001.9	99.0	1012.0	920.9	91.0
2-CDF	1185.0	1007.3	85.0	1185.0	1149.5	97.0
3-CDF	1357.0	1384.1	102.0	1357.0	1438.4	106.0
4-CDF	1530.0	1331.1	87.0	1530.0	1392.3	91.0
5-CDF	1702.0	1685.0	99.0	1702.0	1531.8	90.0

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en el sedimento.

Del mismo modo que en el caso anterior, se aplicó el proceso de extracción por microondas a una muestra de sedimento marino previamente acondicionada con una mezcla de todos los PCBs y PCDFs estudiados. Esta muestra fue sometida, por un lado, a las condiciones más adecuadas establecidas para los PCBs, y por otro, se sometió a condiciones óptimas de los PCDFs.

Los resultados obtenidos bajo ambas condiciones se muestran en las Tablas XXXVII y XXXVIII respectivamente.

Tabla XXXVII.- Resultados obtenidos tras aplicar MAE, bajo condiciones óptimas para los PCBs, a una muestra de sedimento marino que contenía una mezcla de PCBs y PCDFs.

Potencia de extracción: 40%; Tiempo de extracción: 25, 10, 10 min.

Analito	POLE			Genapol X-080		
	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.
BF	771.0	508.9	66.0	771.0	524.3	68.0
DBFo	840.0	596.4	71.0	840.0	604.8	72.0
MBF	943.0	622.4	66.0	943.0	631.8	67.0
1-CDF	1012.0	738.8	73.0	1012.0	738.8	73.0
DBF	1115.0	914.3	82.0	1115.0	914.3	82.0
TriBF	1288.0	850.1	66.0	1288.0	914.5	71.0
TBF	1460.0	1197.2	82.0	1460.0	1182.6	81.0
3-CDF	1357.0	922.8	68.0	1357.0	1126.3	83.0
4-CDF	1530.0	1162.8	76.0	1530.0	1224.0	80.0
HBf	1800.0	1350.0	75.0	1800.0	1404.0	78.0
5-CDF	1702.0	1463.7	86.0	1702.0	1514.8	89.0

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en el sedimento.

Tabla XXXVIII.- Porcentajes de recuperación obtenidos para una muestra de sedimento marino, bajo condiciones óptimas para los PCDFs en POLE, que contenía una mezcla de PCBs y PCDFs.

Potencia de extracción: 80%; Tiempo de extracción: 15, 10, 10 min.

Analito	POLE			Genapol X-080		
	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.
BF	771.0	478.0	62.0	771.0	478.0	62.0
DBFo	840.0	588.0	70.0	840.0	588.0	70.0
MBF	943.0	594.1	63.0	943.0	546.9	58.0
1-CDF	1012.0	759.0	75.0	1012.0	617.3	61.0
DBF	1115.0	914.3	82.0	1115.0	836.3	75.0
TriBF	1288.0	863.0	67.0	1288.0	798.6	62.0
TBF	1460.0	1226.4	84.0	1460.0	1168.0	80.0
3-CDF	1357.0	868.5	64.0	1357.0	841.3	62.0
4-CDF	1530.0	1101.6	72.0	1530.0	1101.6	72.0
HBf	1800.0	1278.0	71.0	1800.0	1134.0	63.0
5-CDF	1702.0	1480.7	87.0	1702.0	1395.6	82.0

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en el sedimento.

7.6.- Evaluación estadística del método.

El estudio estadístico sobre la precisión y exactitud de la metodología optimizada para la extracción, preconcentración y determinación de los PCBs y PCDFs presentes en muestras de sedimentos marinos, se realizó sometiendo a seis muestras, con una concentración de analito incluida en el intervalo de

concentraciones establecido, al proceso completo de extracción asistida por microondas y la determinación posterior por HPLC y fluorescencia.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XXXIX y XL. Junto a estos resultados se muestran los Límites de Detección para cada analito.

Tabla XXXIX.- Parámetros estadísticos y Límites de Detección para la determinación de PCBs en sedimentos marinos mediante el uso de MAE.

		BF	MBF	DBF	TriBF	TBF	PBF	HBf
POLE	$\sigma^{\#}$	0.54	0.59	0.54	2.11	2.28	1.47	1.25
	σ_m^*	0.22	0.24	0.22	0.86	0.93	0.60	0.51
	L.D. [¥]	0.62	1.89	1.11	2.45	0.89	4.89	2.89
Genapol X-080	$\sigma^{\#}$	0.32	1.94	1.08	0.69	1.03	1.57	0.81
	σ_m^*	0.13	0.79	0.44	0.28	0.42	0.64	0.33
	L.D. [¥]	0.70	0.94	0.70	2.8	1.46	4.89	3.61

#: Desviación estandard; *: Desviación estandard media.; ¥: Límite de Detección en ng.ml⁻¹

Tabla XL.- Parámetros estadísticos y Límites de Detección para la determinación de PCDFs en sedimentos marinos mediante el uso de MAE.

		DBFo	1-CDF	2-CDF	3-CDF	4-CDF	5-CDF
POLE	$\sigma^{\#}$	2.34	4.99	0.37	0.40	0.35	0.76
	σ_m^*	1.05	2.23	0.16	0.16	0.15	0.34
	L.D. [¥]	0.42	1.92	1.23	2.66	1.04	3.06
Genapol X-080	$\sigma^{\#}$	1.21	1.54	0.76	0.94	0.72	0.87
	σ_m^*	0.54	0.69	0.34	0.38	0.32	0.39
	L.D. [¥]	0.50	1.92	1.89	2.99	1.53	5.10

#: Desviación estandard; *: Desviación estandard media.; ¥: Límite de Detección en ng.ml⁻¹

8.- Aplicación de la metodología de extracción por microondas a muestras de sedimentos marinos

Una vez se han optimizado los diferentes parámetros que afectan al proceso MAE y establecidos los parámetros analíticos, la metodología propuesta ha sido aplicada a dos sedimentos diferentes, procedentes de dos zonas costeras de la Isla de Gran Canaria (Islas Canarias): playa de “Las Canteras”, situada en la zona NE de la isla, y el puerto de “Taliarte”, situado en la zona SE.

Las muestras procedentes de estas zonas presentan características diferentes, tanto de composición como de tamaño. El sedimento procedente de la playa de “Las Canteras” es arena con un alto contenido calcáreo, puesto que procede de la concha de organismos marinos. El tamaño de las partículas es grande y presentan una textura gruesa. En cuanto al sedimento procedente del puerto de “Taliarte”, hay que mencionar que es un sedimento de tamaño más fino y textura más suave, de tipo limoso.

Previo al acondicionamiento de estos sedimentos con los analitos en estudio como se indica en la Parte Experimental, se han eliminado posibles interferencias limpiando la muestra con agua destilada, y seleccionando posteriormente la fracción inferior a 150 $\mu\text{m.}$, para realizar el proceso.

8.1.- Aplicación a sedimentos con presencia de PCBs

Los resultados obtenidos tras la aplicación de la metodología de extracción con microondas y posteriormente la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia se muestran en las Tablas XLI y XLII. En ellos se observa que los porcentajes de recuperación obtenidos son muy satisfactorios para todos los analitos estudiados, en presencia de ambos surfactantes, salvo para el caso del POLE cuando se utiliza como extractante en una muestra de sedimento procedente de “Las Canteras”. En este caso, la recuperación del BF y MBF es

baja, pudiendo ser debido a un reducido poder extractante del POLE, siendo mayor la afinidad de las moléculas de analito por el sedimento que por las micelas del extractante.

Tabla XLI.- Porcentajes de recuperación obtenidos para los PCBs tras aplicar el proceso de extracción por microondas al sedimento procedente de la playa de "Las Canteras".

Analito	POLE			Genapol X-080		
	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.
BF	771.0	331.5	43.0	771.0	624.5	81.0
MBF	943.0	518.6	55.0	943.0	867.6	92.0
DBF	1115.0	1025.8	92.0	1115.0	1014.6	91.0
TriBF	1288.0	1159.2	90.0	1288.0	1159.2	90.0
TBF	1460.0	1474.6	101.0	1460.0	1314.0	90.0
PBF	1632.0	1583.0	97.0	1632.0	1550.4	95.0
HBF	1800.0	1764.0	98.0	1800.0	1710.0	95.0

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en el sedimento.

Tabla XLII.- Porcentajes de recuperación obtenidos para los PCBs tras aplicar el proceso de extracción por microondas al sedimento procedente del puerto de "Taliarte".

Analito	POLE			Genapol X-080		
	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.
BF	771.0	585.9	76.0	771.0	709.3	92.0
MBF	943.0	810.9	86.0	943.0	895.8	95.0
DBF	1115.0	1148.4	103.0	1115.0	1025.8	92.0
TriBF	1288.0	1184.9	92.0	1288.0	1223.6	95.0
TBF	1460.0	1343.2	92.0	1460.0	1372.4	94.0
PBF	1632.0	1648.3	101.0	1632.0	1599.3	98.0
HBF	1800.0	1782.0	99.0	1800.0	1800.0	100.0

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en el sedimento.

8.2.- Aplicación a sedimentos que contienen PCDFs

Del mismo modo que para el caso anterior, una vez que la metodología ha sido optimizada, ésta se aplica a dos sedimentos marinos diferentes que contienen PCDFs.

Los resultados obtenidos en estos estudios, indican recuperaciones altamente satisfactorias para todos los compuestos, independientemente del medio micelar que utilizado para su extracción. Estos resultados se muestran en las Tablas XLIII y XLIV.

Tabla XLIII.- Porcentajes de recuperación obtenidos para los PCDFs tras aplicar el proceso de extracción por microondas al sedimento procedente de la playa de "Las Canteras".

Analito	POLE			Genapol X-080		
	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco.* ng.ml ⁻¹	% Rec.
DBFo	840.0	831.6	99.0	840.0	789.6	94.0
1-CDF	1012.0	1001.8	99.0	1012.0	920.9	91.0
2-CDF	1185.0	1007.2	85.0	1185.0	1149.4	97.0
3-CDF	1357.0	1384.1	102.0	1357.0	1438.4	106.0
4-CDF	1530.0	1331.1	87.0	1530.0	1392.3	91.0
5-CDF	1702.0	1684.9	99.0	1702.0	1531.8	90.0

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en el sedimento.

Tabla XLIV.- Porcentajes de recuperación obtenidos para los PCDFs tras aplicar el proceso de extracción por microondas al sedimento procedente del puerto de "Taliarte".

Analito	POLE			Genapol X-080		
	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco*. ng.ml ⁻¹	% Rec.	Añad. ng.ml ⁻¹	Enco*. ng.ml ⁻¹	% Rec.
DBF ₀	840.0	798.0	95.0	840.0	756.0	90.0
1-CDF	1012.0	1012.0	100.0	1012.0	931.0	92.0
2-CDF	1185.0	1196.8	101.0	1185.0	1208.7	102.0
3-CDF	1357.0	1370.5	101.0	1357.0	1262.0	93.0
4-CDF	1530.0	1468.8	96.0	1530.0	1514.7	99.0
5-CDF	1702.0	1684.9	99.0	1702.0	1650.9	97.0

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en el sedimento.

8.3.- Aplicación a sedimentos que contienen mezclas de PCBs y PCDFs

Al igual que para ambas familias por separado, la aplicación del proceso de extracción por microondas, se comprobó en muestras de ambos sedimentos marinos que habían sido previamente acondicionados con mezclas de todos los analitos en estudio. Al estar presentes analitos de diferentes características, y habiéndose observado que las condiciones óptimas del proceso de extracción dependen de los mismos, la extracción se llevó a cabo utilizando, por un lado, las condiciones establecidas para los PCBs, y por otro, las condiciones óptimas de los PCDFs.

La concentración utilizada para este estudio se estableció en un intervalo ligeramente superior al utilizado para ambas familias por separado. Esto se debe a las limitaciones del sistema en lo referido a la cuantificación, no así la identificación, de los diferentes PCBs y PCDFs en la mezcla.

El cromatograma presentado en la Figura 43 muestra la elución de una mezcla de PCBs y PCDFs tras aplicar la metodología de extracción asistida por

microondas a una muestra de sedimento marino procedente de la playa de "Las Canteras" (Gran Canaria).

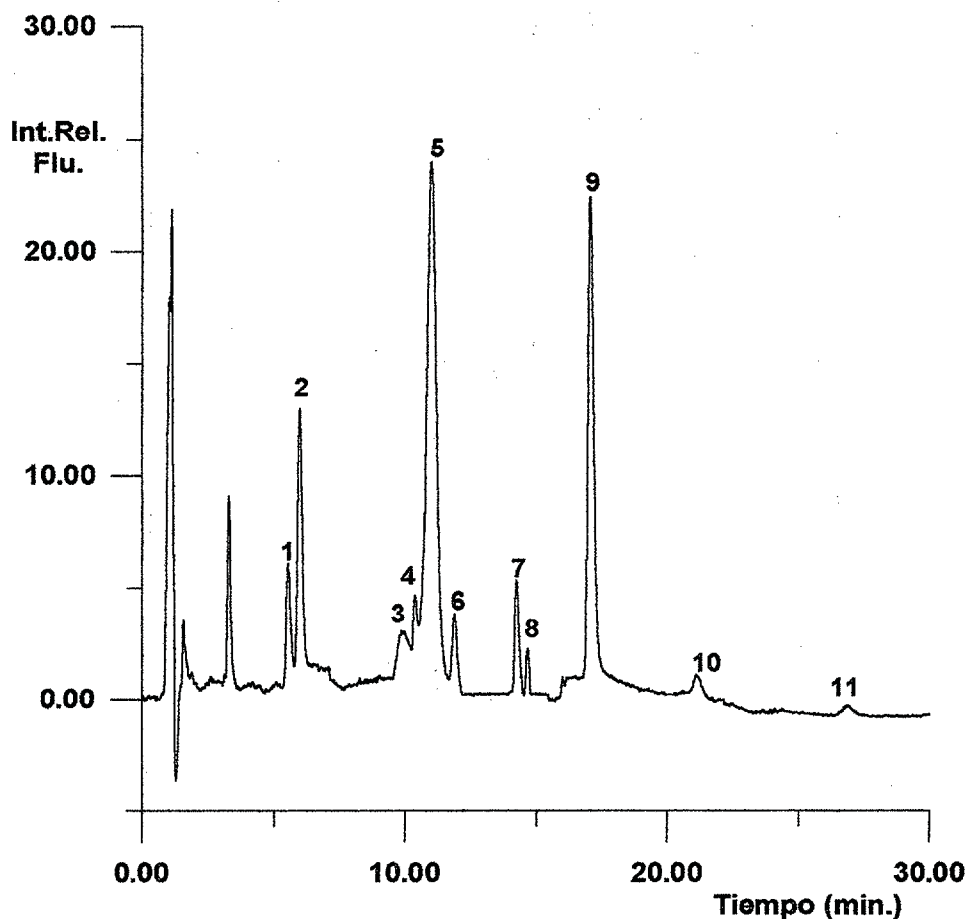


Figura 43 - Cromatograma obtenido para una muestra de sedimento procedente de la playa de "Las Canteras" (Gran Canaria) tras aplicar la metodología de extracción asistida por microondas para la determinación de una mezcla de PCBs y PCDFs, utilizándose el POLE como medio extractante.

1.- BF; 2.- DBF_o; 3.- MBF; 4.- 1-CDF; 5.- DBF; 6.- TriBF; 7.- 3-CDF; 8.- TBF;
9.- 4-DCF; 10.- HBF; 11.- 5-CDF

Los porcentajes de recuperación obtenidos para las mezclas estudiadas, bajo ambas condiciones de extracción, se muestran en las Tablas XLV y XLVI.

Tabla XLV.- Porcentajes de recuperación obtenidos tras aplicar MAE a muestras de sedimentos procedentes de la playa de “Las Canteras”, que contienen mezclas de PCBs y DFPs

Analito	POLE #			POLE-2 ^ψ			Genapol X-080 #			Genapol X-080 ^ψ		
	Añad. mg.L. ⁻¹	Enco.* mg.L. ⁻¹	% Rec.	Añad. mg.L. ⁻¹	Enco.* mg.L. ⁻¹	% Rec.	Añad. mg.L. ⁻¹	Enco.* mg.L. ⁻¹	% Rec.	Añad. mg.L. ⁻¹	Enco.* mg.L. ⁻¹	% Rec.
BF	1.54	0.95	61.7	1.54	1.02	66.2	1.54	0.95	61.7	1.54	1.05	68.2
DBFo	1.68	1.17	69.6	1.68	1.19	70.8	1.68	1.18	70.2	1.68	1.21	72.0
MBF	3.77	2.37	62.9	3.77	2.49	66.0	3.77	2.19	58.1	3.77	2.53	67.1
1-CDF	3.04	2.28	75.0	3.04	2.22	73.0	3.04	1.85	60.9	3.04	2.22	73.0
DBF	3.34	2.74	82.0	3.34	2.74	82.0	3.34	2.50	74.9	3.34	2.74	82.0
TriBF	5.15	3.45	67.0	5.15	3.4	66.0	5.15	3.19	61.9	5.15	3.65	70.9
TBF	4.38	3.68	84.0	4.38	3.60	82.2	4.38	3.50	79.9	4.38	3.55	81.1
3-CDF	5.43	3.47	63.9	5.43	3.69	68.0	5.43	3.37	62.1	5.43	4.51	83.1
4-CDF	3.06	2.20	71.9	3.06	2.32	75.8	3.06	2.20	71.9	3.06	2.45	80.1
HBF	5.41	3.84	71.0	5.41	4.05	74.9	5.41	3.41	63.0	5.41	4.22	78.0
5-CDF	5.11	4.44	86.9	5.11	4.39	85.9	5.11	4.19	82.0	5.11	4.55	89.0

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en disolución.

Condiciones óptimas para los DFPs ; ^ψ Condiciones óptimas para los PCBs

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla XLVI.- Porcentajes de recuperación obtenidos tras aplicar MAE a muestras de sedimentos procedentes del puerto de "Taliarte", que contienen mezclas de PCBs y DFPs

Analito	POLE #			POLE-2 ψ			GENAPOL X-080 #			GENAPOL X-080 ψ		
	Añad. mg.L ⁻¹	Enco.* mg.L ⁻¹	% Rec.	Añad. mg.L ⁻¹	Enco.* mg.L ⁻¹	% Rec.	Añad. mg.L ⁻¹	Enco.* mg.L ⁻¹	% Rec.	Añad. mg.L ⁻¹	Enco.* mg.L ⁻¹	% Rec.
BF	1.54	0.94	61.0	1.54	1.19	77.3	1.54	0.92	59.7	1.54	1.17	76.0
DBFo	1.68	1.19	70.8	1.68	1.26	75.0	1.68	1.11	66.1	1.68	1.29	76.8
MBF	3.77	2.15	57.0	3.77	2.68	71.1	3.77	2.22	58.9	3.77	2.64	70.0
1-CDF	3.04	2.16	71.1	3.04	2.16	71.1	3.04	1.98	65.1	3.04	2.13	70.1
DBF	3.34	2.47	74.0	3.34	2.71	81.1	3.34	2.51	75.1	3.34	2.81	84.1
TriBF	5.15	3.55	68.9	5.15	3.61	70.1	5.15	3.09	60.0	5.15	3.81	74.0
TBF	4.38	3.55	81.1	4.38	3.55	81.1	4.38	3.59	82.0	4.38	3.72	84.9
3-CDF	5.43	3.58	65.9	5.43	3.80	70.0	5.43	3.86	71.1	5.43	4.34	79.9
4-CDF	3.06	2.23	72.9	3.06	2.36	77.1	3.06	2.17	70.9	3.06	2.60	85.0
HBF	5.41	3.90	72.1	5.41	3.95	73.0	5.41	3.95	73.0	5.41	4.00	73.9
5-CDF	5.11	3.99	78.1	5.11	4.45	87.1	5.11	3.68	72.0	5.11	4.34	84.9

* Media de tres determinaciones referidas a la concentración inicial de analito en disolución.

Condiciones óptimas para los DFPs ; ψ Condiciones óptimas para los PCBs

Como puede observarse en los resultados, los porcentajes de recuperación son ligeramente inferiores para todos los analitos cuando las condiciones utilizadas en el proceso de extracción corresponden a las óptimas de los PCDFs. Cuando la extracción se lleva a cabo bajo las condiciones óptimas para los PCBs, los resultados obtenidos para los diferentes PCDFs se mantienen prácticamente constantes, mientras que para los PCBs se mejoran considerablemente. Esta diferencia en la recuperación de los PCBs puede ser debida a tanto a las interacciones que se establecen entre los diferentes analitos, como a la posible volatilización de los PCBs debido a las altas temperaturas alcanzadas al utilizar una potencia elevada. Por tanto, a la hora de analizar muestras de sedimentos marinos que contienen mezclas de PCBs y PCDFs las condiciones a utilizar serán las establecidas como óptimas para los primeros, es decir, una potencia de 40 % y unos tiempos de lavado de 25, 10 y 10 min..

9.- Aplicación de la metodología de extracción por microondas a la extracción de PCBs y PCDFs en muestras de organismos marinos.

Tanto los PCBs como los PCDFs son compuestos clorados sintéticos, persistentes en el medio ambiente, debido a sus propiedades fisicoquímicas, y con un fuerte carácter lipofílico, y por tanto bastante insolubles en agua. Debido a estas propiedades pasan a depositarse tanto en el sedimento de las zonas donde son vertidos, como en la materia particulada. Además, tienen tendencia a bioacumularse en los ácidos grasos de los diferentes organismo que se encuentran en el medio.

Aunque estos compuestos están sujetos a bio- y fotodegradación [139], son altamente estables y se encuentran ampliamente distribuidos. Se han encontrado tanto PCBs como PCDFs en los diferentes niveles de la cadena trófica. Estos compuestos se introducen en la cadena alimenticia a través de los organismos inferiores, pasando a organismos superiores por predación. Así, los PCBs y los PCDFs pueden encontrarse desde muestras de moluscos hasta muestras de leche materna [18,50,140-143]. Algunos ejemplos de organismos en los que se han encontrado estos compuestos, y las concentraciones de los mismos se muestran en la Tabla XLVII.

Como consecuencia del carácter lipofílico de los PCBs y PCDFs, cuando son incorporados por los organismos, bien por adsorción, bien por ingestión, tienden a acumularse en las capas de ácidos grasos o lípidos de los mismos. Los diferentes compuestos organoclorados presentan diferente afinidad respecto a las distintas clases de lípidos. Es por esto que la concentración de estos compuestos variará con la especie, el género, la edad, la masa corporal, la estación, etc.[45]. Pero a la hora de identificar y cuantificar los diferentes PCBs y PCDFs, no sólo es importante el tipo de lípido sino también del congénere que se trate. Esto se debe a que la toxicidad, carácter lipofílico y persistencia son diferentes para cada congénere de la familia. Por ejemplo, los

PCBs coplanares, con átomos de cloro en posiciones diferentes a las *orto*- son los que mayor toxicidad presentan.

Tabla XLVII.- Ejemplos de PCBs y PCDFs en organismos marinos^a.

ZONA	ORGANISMO	ANALITO	ng/g (peso húmedo)
Bahía Newark (U.S.A)	Cangrejo (hepatopaneas)	2,3,7,8-TetraCDF	0.6
	Róbalo (hepatopaneas)		0.38
Mar Báltico	Salmón	PCBs	439
	Arenque		172
Galicia: Ría de Arosa Pontevedra	Mejillón Mejillón	PCBs	183

a) Ref. [18,45,144]

En consecuencia, sería conveniente establecer una normalización de lípidos en referencia a los organismos marinos, puesto que frecuentemente se establece una relación de partición entre los lípidos presentes en un organismo y el agua del medio o el sedimento. De esta manera, se podrían realizar comparaciones en cuanto a la concentración de los diferentes PCBs y PCDFs entre diversas especies, independientemente de su contenido lipídico. La solubilidad de cada uno de los diferentes congéneres en los lípidos, está generalmente relacionada con su coeficiente de partición octanol/agua [18,50]. De ahí que la distribución de estos compuestos organoclorados en los organismos varía en función de su composición en lípidos. Cabe reseñar que los PCDFs presentan menor factor de bioconcentración que los PCBs.

Cuando se quiere determinar la evolución de una zona marina en cuanto al grado de contaminación o el tipo de contaminante, los organismos marinos

pueden utilizarse como modelo. Así, las concentraciones presentes en los tejidos de los diferentes organismos marinos sirven como indicadores de la carga contaminante que soporta el medio, tanto desde el punto de vista espacial como temporal, en el que éstos se encuentran [140,145].

La variedad de organismos marinos en los cuales se han determinado diversos contaminantes, incluidos PCBs y PCDFs, es muy grande; se pueden encontrar estudios realizados desde organismos microscópicos, a peces y mamíferos [32,34], pasando por moluscos [145], crustáceos [146], etc.

La utilización de organismos filtradores, como por ejemplo ostras [147], almejas [148], etc., como indicadores de la contaminación de una región o zona es bien conocido, y dentro de estos pueden destacarse los mejillones. Estos organismos presentan gran capacidad de acumulación de contaminantes, como pueden ser los metales pesados y aquellos compuestos que presentan un fuerte carácter lipofílico. Por otro lado, hay que añadir su pequeño potencial enzimático de degradación de todos estos compuestos [27,144]. Utilizando los organismos filtradores como indicadores se logra simplificar el procedimiento analítico y se reduce el requerimiento de metodologías costosas que necesitan de la toma de muestras de agua. Además, el análisis de tejidos de los mejillones, en lugar de agua, aportan información adicional sobre el grado de biodisponibilidad del contaminante, y en consecuencia sobre la forma en que éste interfiere con los procesos biológicos.

Al igual que en el caso de sedimentos, la determinación de compuestos contaminantes en muestras de organismos marinos requiere de una serie de pasos previos al análisis, como puede ser la obtención de ciertas zonas representativas del organismo, donde la concentración de los analitos pueda cuantificarse, así como la extracción y preconcentración posterior de los mismos para eliminar posibles interferencias. Las muestras del organismo tomadas para los análisis suelen corresponder principalmente a tejidos con un alto contenido en lípidos, como el hepatopáncreas o los músculos. Una vez que

se tienen las muestras, las técnicas de extracción, previas al análisis, más utilizadas son la extracción convencional mediante disolventes orgánicos [140,144], Soxhlet [27,143,144] y la extracción por microondas mediante disolventes orgánicos [142,149]. Cada uno de estos métodos varía en cuanto a su efectividad de extracción de los lípidos, y por tanto los resultados obtenidos dependerán de este factor.

En el trabajo desarrollado en esta Tesis, el organismo elegido para el estudio de los PCBs y PCDFs ha sido el mejillón (*Mytilus edulis*), debido a su alto carácter filtrador. La metodología que se ha optimizado para la determinación de dichos compuestos es la Extracción Asistida por Microondas (MAE), con la diferencia que en este caso el extractante es un medio micelar no iónico. Los surfactantes utilizados en este estudio son el Oligoetilen Glicol Monoalquil eter (Genapol X-080) y el Polioxietilen 10 Lauril eter (POLE), siendo los mismos que se utilizaron en el caso del análisis de muestras de sedimentos marinos.

9.1.- Optimización de la metodología de Extracción por Microondas para la determinación de PCBs.

En este estudio partimos de unas condiciones iniciales que corresponden a las óptimas establecidas en el apartado anterior, es decir, las muestras se someten a extracción con 20 ml. de la disolución extractante, de pH ácido, tres etapas de lavado y una potencia de extracción del 40 %.

9.1.1.- Genapol X-080

Los resultados obtenidos utilizando el Genapol X-080, tras esta primera extracción utilizando una primera etapa de acondicionamiento de 25 min., y dos mas de extracción de 10 min. cada uno, (1) 25,10,10 min., muestran bajos porcentajes de recuperación para todos los analitos (Tabla XLVIII). Si

representamos los porcentajes de recuperación frente al analito al que corresponden, se observan fluctuaciones en función del número de átomos de cloro en la molécula (Figura 44). Los mejores porcentajes se obtienen para aquellos analitos con número par de átomos de cloro.

Con el fin de mejorar estos resultados y conseguir las condiciones óptimas de recuperación, se procedió a variar los tiempos de las diferentes etapas de lavado. De esta manera, diferentes muestras previamente acondicionadas, se sometieron al proceso de extracción bajo las nuevas condiciones, las cuales se establecieron por un lado en un incremento del tiempo global de extracción, (2) 25,15,15 min., y por otro, una variación de los tiempos correspondientes a cada una de las diferentes etapas, (3) 15,15,15 min. Los resultados obtenidos bajo estas nuevas condiciones no mostraron mejoras en los porcentajes de recuperación de los diferentes PCBs en estudio (Tabla XLVIII).

Tabla XLVIII.- Variación de los porcentajes de extracción de los PCBs con el tiempo de extracción, utilizando Genapol X-080 como extractante.

	BF	MBF	DBF	TriBF	TBF	PBF	HBf
25,10,10*	29	23	39	29	57	31	42
25,15,15*	21	10	38	13	41	26	43
15,15,15*	29	24	56	23	27	24	29

* Tiempo en minutos

La representación gráfica de los mismos permite comprobar que el comportamiento de los analitos es el mismo que para las condiciones anteriores, observándose fluctuaciones en los valores de recuperación que dependen de su estructura molecular (Figura 44). Esto hace pensar que el

Genapol X-080 no es un buen extractante de estos analitos cuando se encuentran en muestras de organismos.

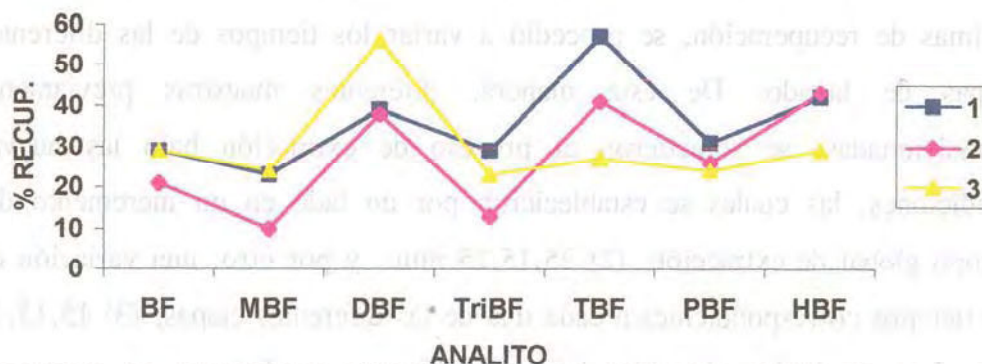


Figura 44.- Variación de los porcentajes de recuperación con el tiempo de extracción para cada analito. (1) 25, 10, 10 min., (2) 25, 15, 15 min., (3) 15, 15, 15 min.

Podemos suponer por tanto, que como la efectividad del método depende de su poder para interactuar o extraer los lípidos del organismo, el Genapol X-080 no es capaz de realizar adecuadamente esta extracción. Además, las fluctuaciones observadas en los porcentajes, ratifican lo anteriormente citado en cuanto a la diferencia del carácter lipofílico de los diferentes congéneres de una familia de analitos, en función de su estructura molecular.

9.1.2.- POLE

Los resultados obtenidos para este surfactante en las condiciones iniciales, indican porcentajes de recuperación ligeramente superiores a los

presentados por el Genapol X-080, aunque siguen siendo bajos (Tabla XLIX). De la misma forma que en el caso anterior, se realizaron nuevas extracciones, estableciéndose como condiciones los siguientes tiempos de extracción: (2) 25,15,15 min. y (3) 15,15,15 min.. Los porcentajes de recuperación obtenidos para estos tiempos aumentan ligeramente con respecto a los anteriores, observándose mejores recuperaciones para el caso de los analitos con mayor número de átomos de cloro.

Tabla XLIX.- Variación de los porcentajes de extracción de los PCBs con el tiempo de extracción, utilizando POLE como extractante.

	BF	MBF	DBF	TriBF	TBF	PBF	HBF
25,10,10*	42	46	59	63	77	76	79
25,15,15*	30	50	56	69	72	73	64
15,15,15*	32	34	69	75	77	75	78

* Tiempo en minutos

Tras comprobar los resultados, y con objeto de mejorar el paso del analito desde la matriz lipofílica al surfactante, se consideró como una nueva alternativa aumentar en uno el número de lavados, de tal forma que la extracción se realice en cuatro lavados, (4) 20,10,10,10 min. Bajo estas condiciones, los porcentajes de recuperación de los analitos con menor peso molecular aumentan ligeramente, mientras que los correspondientes a los de mayor peso molecular se mantienen prácticamente constantes respecto a las condiciones anteriores (Tabla L).

Una vez establecidas en cuatro las etapas de lavado, se realizó un nuevo estudio variando la potencia de extracción. En las nuevas extracciones se trabajará con potencias del 80%, y se utilizarán dos nuevos intervalos de

tiempo: (5) 20,10,10,10 min. y (6) 10,10,10,10 min., con lo que obtendremos mayor información sobre el efecto que producen ambos factores en el proceso de extracción. Los porcentajes de recuperación obtenidos para los distintos analitos bajo estas nuevas condiciones son inferiores a los anteriores (Tabla L), por lo que se considerarán las condiciones (4) 20,10,10,10 min. y potencia de 40 % como las más adecuadas.

Tabla L.- Variación de los porcentajes de extracción de los PCBs con el tiempo de extracción, utilizando POLE como extractante.

	BF	MBF	DBF	TriBF	TBF	PBF	HBF
20,10,10,10*	48	51	62	69	79	69	51
20,10,10,10*#	42	44	49	51	58	62	66
10,10,10,10*#	37	43	49	56	78	66	67

* Tiempo en minutos; # potencia del 80%

Si representamos gráficamente los resultados obtenidos para cada uno de los diferentes intervalos, frente al correspondiente analito, se observa un aumento del porcentaje de recuperación a medida que aumenta el peso molecular del analito (Figura 45). También puede observarse que las variaciones en los porcentajes de recuperación de cada analito para las diferentes condiciones son prácticamente inexistentes.

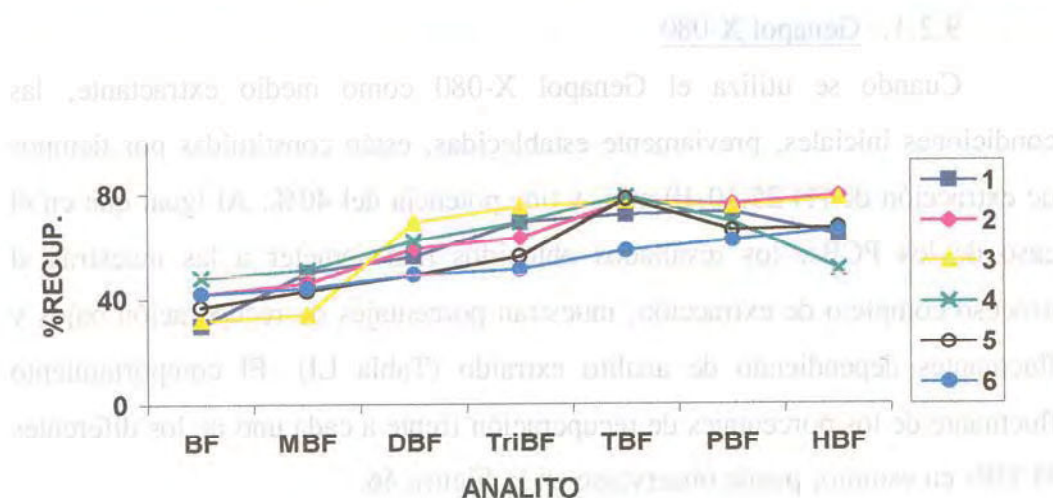


Figura 45.- Variación de los porcentajes de recuperación con el tiempo de extracción para cada analito. (1) 25,10,10 min., (2) 25,15,15 min., (3) 15,15,15 min., (4) 20,10,10,10 min., (5) 20,10,10,10 min., potencia: 80%, (6) 10,10,10,10 min., potencia: 80%.

9.2.- Optimización de la metodología de Extracción por Microondas para la determinación de PCDFs.

Para el estudio de la extracción y determinación de PCDFs presentes en muestras de organismos marinos mediante la metodología de extracción por microondas, se parte de las condiciones óptimas establecidas en el apartado del análisis de los sedimentos, puesto que estudios previos indicaron que tanto el pH como el volumen de la disolución extractante, no afectan a la extracción. A diferencia de los PCBs, cuando se quiere analizar una muestra sólida que contiene PCDFs, las condiciones óptimas de extracción mediante MAE, difieren para cada uno de los dos surfactantes utilizados.

9.2.1.- Genapol X-080

Cuando se utiliza el Genapol X-080 como medio extractante, las condiciones iniciales, previamente establecidas, están constituidas por tiempos de extracción de (1) 25,10,10 min. y una potencia del 40%. Al igual que en el caso de los PCBs, los resultados obtenidos tras someter a las muestras al proceso completo de extracción, muestran porcentajes de recuperación bajos y fluctuantes dependiendo de analito extraído (Tabla LI). El comportamiento fluctuante de los porcentajes de recuperación frente a cada uno de los diferentes PCDFs en estudio, puede observarse en la Figura 46.

Tabla LI.- Variación de los porcentajes de extracción de los PCDFs con el tiempo de extracción, utilizando el Genapol X-080 como extractante.

	DBFo	1-CDF	2-CDF	3-CDF	4-CDF	5-CDF
25,10,10*	25	23	49	14	35	29
25,15,15*	38	31	39	25	40	23
15,15,15*	33	28	39	20	36	26

* Tiempo en minutos

Con objeto de lograr mejores porcentajes de recuperación, y siguiendo los pasos anteriormente realizados, se varían los tiempos de los diferentes pasos de lavado, utilizándose los mismos intervalos que para los PCBs: (2) 25,15,15 min. y (3) 15,15,15 min. Estas nuevas condiciones tienen como resultado porcentajes de recuperación muy similares a los anteriores, manteniéndose siempre por debajo de valores que pueden considerarse como satisfactorios (Tabla LI). De aquí que concluyamos que el Genapol X-080 no sea un medio extractante adecuado para la determinación de PCDFs presentes en organismos marinos.

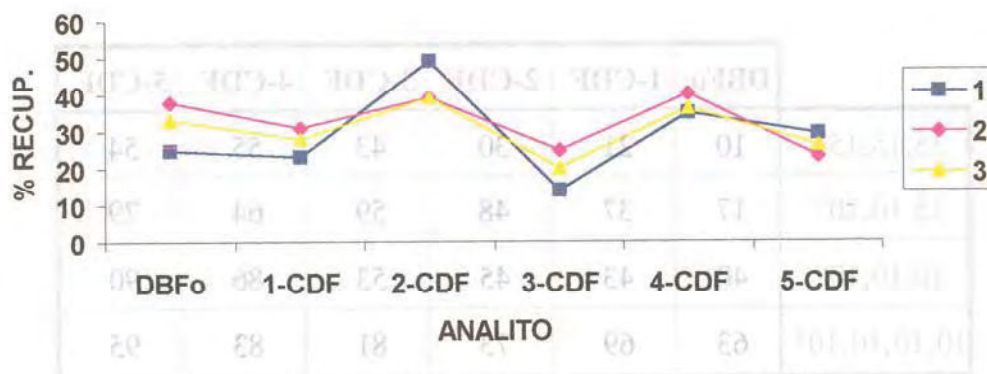


Figura 46.- Efecto de la variación del tiempo de extracción sobre los porcentajes de recuperación de los PCDFs. (1) 25, 10, 10 min., potencia: 40%; (2) 25, 15, 15 min., potencia de 40%; (3) 15, 15, 15 min., potencia de 40%

9.2.2.- POLE

Tras observar el comportamiento similar de los PCBs y PCDFs utilizando Genapol X-080 como extractante, se ha optado por realizar un estudio más completo desde el momento inicial para el caso de los PCDFs con POLE. Además de las condiciones de partida: tiempos de extracción (1) 15,15,15 min. y potencia del 80%, las muestras fueron sometidas a otros dos intervalos de tiempo adicionales: (2) 15,10,10 min. y (3) 10,10,10 min., manteniéndose en ambos casos la potencia inicial. Los porcentajes de recuperación obtenidos para los distintos analitos tras aplicar las condiciones de extracción a las muestras, son inicialmente bajos, observándose un aumento de los mismos a medida que se reduce el tiempo global de extracción (Tabla LII). En todos los tres casos, los analitos muestran un comportamiento similar: a mayor número de átomos de cloro en la molécula, mayor porcentaje de recuperación se obtiene (Figura 47).

Tabla LII.- Influencia del tiempo de extracción en los porcentajes de recuperación de los PCDFs, utilizando POLE como extractante.

	DBF ₀	1-CDF	2-CDF	3-CDF	4-CDF	5-CDF
15,15,15*	10	21	30	43	55	54
15,10,10*	17	37	48	59	64	79
10,10,10*	40	43	45	53	86	90
10,10,10,10*	63	69	73	81	83	95

* Tiempo en minutos

Como puede comprobarse, los mejores resultados se obtienen para las condiciones (3), 10,10,10 min., acercándose los porcentajes de recuperación a valores satisfactorios. Teniendo presente el comportamiento mostrado por los diferentes analitos frente a la variación del tiempo de extracción, se realiza una nueva extracción añadiéndose una nueva etapa de lavado a estas condiciones, estableciéndose las nuevas condiciones en intervalos de tiempo de (4) 10,10,10,10 min. y una potencia del 80%. Los resultados obtenidos bajo estas condiciones, muestran porcentajes de recuperación mayores que los anteriores, considerándose los valores obtenidos como bastante satisfactorios para todos los PCDFs estudiados. Los valores de los porcentajes de recuperación son ligeramente inferiores para aquellos analitos de menor peso molecular (Tabla LII, Figura 47).

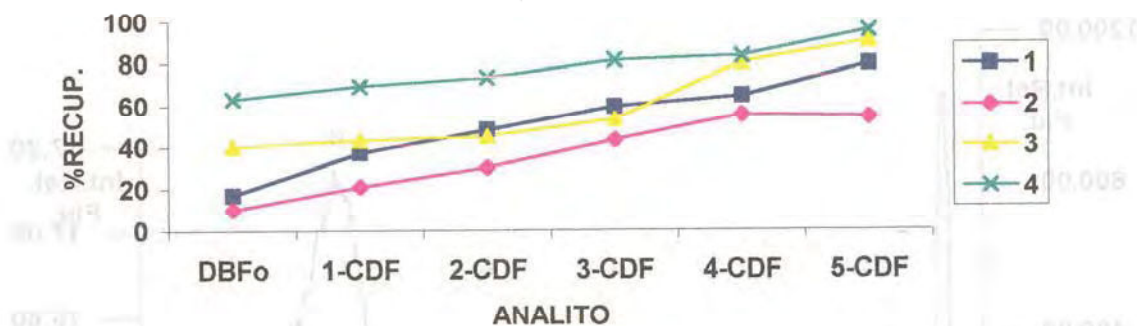


Figura 47.- Efecto de la variación del tiempo de extracción en los porcentajes de recuperación. (1) 15, 15, 15 min., potencia de 80%; (2) 15, 10, 10 min., potencia: 80%; (3) 10, 10, 10 min., potencia: 80%; (4) 10, 10, 10, 10 min., potencia: 80%

Teniendo presentes estos resultados, podemos decir que el POLE puede ser utilizado como medio extractante en el proceso de Extracción Asistida por Microondas para los analitos en estudio presentes en muestras de organismos marinos.

En la Figura 48 podemos observar el cromatograma obtenido tras la aplicación de la metodología de extracción asistida por microondas a una muestra de organismo marino.

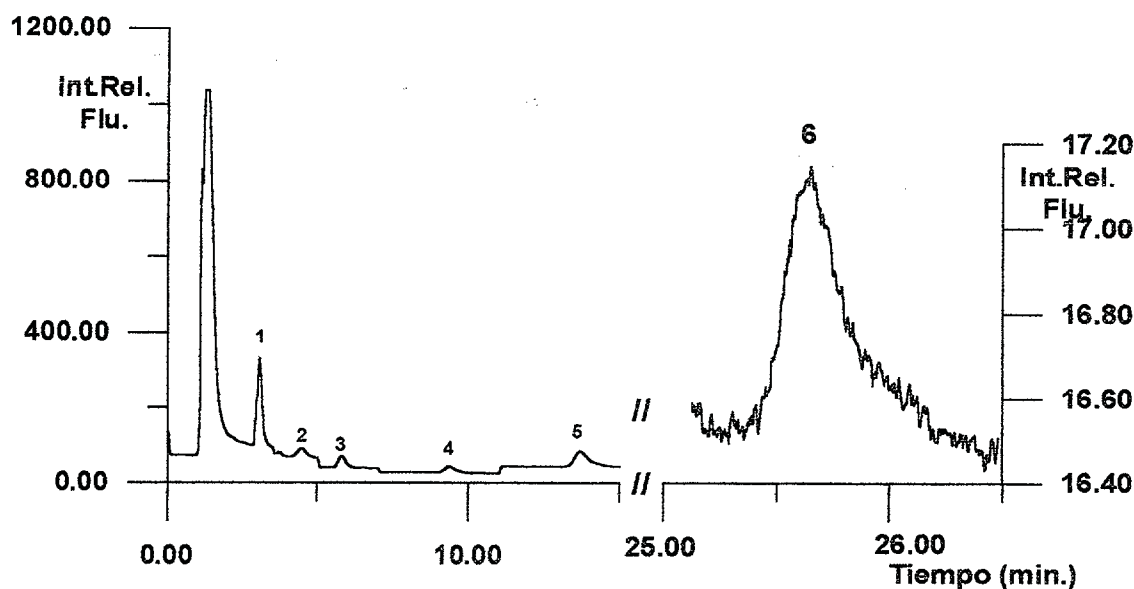


Figura 48.- Cromatograma obtenido en la determinación de seis PCDFs presentes en una muestra de *Mytilus edulis* tras aplicar la metodología de MAE.

1.- DBFo; 2.- 1-CDF; 3.- 2-CDF; 4.- 3-CDF; 5.- 4-CDF; 6.- 5-CDF

Cuando se comparan los resultados obtenidos en los estudios anteriores con los encontrados para los mismos analitos en sedimentos, se observa una clara disminución de las recuperaciones de los mismos para las muestras de organismos.

Esto puede ser debido por una parte a la volatilidad de los analitos de menor peso molecular, y por otro al hecho de que los analitos en estudio presentan una mayor afinidad por la matriz lipofílica que por el medio extractante.

EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

1.- Aparatos utilizados

1.1.- *Estudios fluorimétricos*

Todos los espectros, así como las medidas de fluorescencia realizados para la caracterización de los compuestos, se han llevado a cabo mediante un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin-Elmer, modelo LS-50, dotado de una lámpara de xenón, unido a un ordenador Ataió 3000-SX. Las células utilizadas para el análisis de las muestras en estudio son de cuarzo, con un paso de luz de un centímetro.

1.2.- *Estudios conductimétricos*

El cálculo de las concentraciones micelares críticas se ha realizado utilizando un conductímetro Crison modelo 25.

1.3.- *Determinación de la temperatura de “Punto de Nube”*

Este estudio ha sido realizado mediante la utilización de un baño termostatzado de la marca Selecta, modelo Tectron 3473200. La centrifugación de las muestras, para facilitar la separación de fases, se realizó mediante el uso de una centrífuga marca Selecta, modelo Mixtasel.

1.4.- *Extracción en muestras sólidas*

El sistema de microondas utilizado es un “Microwave Digestion System”, modelo MSD-81D, de la marca CEM Corporation, con recipientes especiales de teflón para el tratamiento de las muestras.

Para el acondicionamiento de las muestras sólidas utilizadas a lo largo de los diversos estudios realizados, se utilizó un sistema rotativo de fabricación propia, realizado por el personal técnico del Departamento de Química de la

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, y que consta de: un motor rotatorio, una barra metálica y unas placas de metacrilato donde se colocaban los tubos que contenían diferentes muestras.

1.5.- Determinación cromatográfica

El sistema cromatográfico utilizado corresponde a la marca Waters Cromatografía, controlado por el software Millennium 2.15, de la misma marca, y compuesto por una bomba Waters 510 HPLC Pump, un inyector Rheodyne 7725i, y un detector de fluorescencia conectado en línea, también de la marca Waters, modelo 474. El tipo de columna cromatográfica utilizada a lo largo de toda la investigación es una Nova-pack C₁₈ 3.9 x 150 mm de Waters (con empaque de partículas de 4 µm) habiéndose colocado, previa a la columna, una precolumna, de la misma marca comercial, con las mismas características de partícula que aquella.

Las jeringas utilizadas para la inyección fueron de un volumen de 25 µl., tipo Hamilton, pertenecientes a la casa Aldrich Chemical Company. Para la extracción del volumen de fase rica en surfactante se utilizaron agujas de 13 cm de longitud, mientras que para todos los demás estudios se utilizaron agujas convencionales.

En los estudios de extracción de sedimentos marinos, la disolución extraída, que contiene los analitos a determinar, se filtra a través de filtros Millipore: Millex-HA estériles, de 0.45 µm., con objeto de eliminar las posibles impurezas sólidas.

2.- Reactivos y Disoluciones empleados

2.1.- Reactivos

Todos los PCBs y PCDFs utilizados en los diversos estudios realizados a lo largo del desarrollo de esta Tesis, se adquirieron en Accustandard. Inc, y presentan todos ellos una pureza del 99%.

Los diferentes surfactantes no iónicos, salvo el Genapol X-080, que procede de la marca Fluka, se adquirieron de Sigma Chemical Co.

El etanol utilizado para preparar las disoluciones patrón de los analitos corresponde a la marca Merck, mientras que el metanol utilizado como componente de la fase móvil cromatográfica, es de la marca Panreac (grado HPLC). A esta casa corresponde también el nitrato potásico utilizado para la realización del estudio de la influencia de la fuerza iónica en la optimización de condiciones en la metodología de Punto de Nube.

El agua utilizada en la preparación de las diferentes disoluciones así como para la preparación de la fase móvil del sistema de HPLC, se obtiene de un sistema de purificación de agua Milli-Q (casa Millipore, U.S.A.).

2.2.- Disoluciones

Las disoluciones patrón de los analitos se han obtenido disolviendo cantidades adecuadas de cada uno de los mismos en etanol absoluto, de forma que la concentración final de las mismas sea de 1.0×10^{-4} M.

Para la preparación de las disoluciones patrón de los diferentes surfactantes no iónicos utilizados a lo largo de los estudios realizados, las correspondientes cantidades de surfactante se disuelven en agua Milli-Q. Las disoluciones de menor concentración utilizadas para los diferentes estudios se preparan por dilución de las anteriores en agua Milli-Q.

En el caso de surfactantes en estado sólido, la cantidad necesaria se obtenía por pesada directa, mientras que para el caso de aquellos que se

encontraban es estado líquido, se medía el volumen correspondiente a la cantidad, en gramos, necesaria para preparar la disolución.

3.- Procedimientos Operativos

3.1.- Obtención de los espectros de excitación y de emisión de los PCBs PCDFs

Se preparan en matraces aforados de 25 ml. disoluciones que contienen 470 mg.ml⁻¹ de analito a partir de la disolución patrón, añadiéndose un volumen de etanol en cantidad suficiente como para ajustar la misma a una concentración del 2% (v/v), y aforándose finalmente con agua Milli-Q. Estas disoluciones, que contienen una concentración de compuesto de 1.0x10⁻⁶ M, se utilizan para la obtención de los correspondientes espectros de excitación y emisión. Para la mayoría de los analitos se usan rendijas de 5 nm, excepto para los reactivos no clorados (el BF y el DBFo), en cuyo caso se utilizan rendijas de 2.5 nm.

3.2.- Determinación conductimétrica de la "concentración micelar crítica"

Para la obtención de la concentración micelar crítica de los diversos surfactantes, se parte de una disolución acuosa a la cual se le van añadiendo diferentes volúmenes de una disolución concentrada del surfactante en estudio. Mediante la conductividad medida de forma directa sobre las diferentes disoluciones, cuya concentración en surfactante va aumentando, se calcula la conductividad real. Esta conductividad real se obtiene mediante la fórmula:

$$\text{Conductividad real} = \text{conductividad medida} \times [(V_{\text{inicial}} + V_{\text{añadido}}) / V_{\text{inicial}}]$$

La representación gráfica de estos valores experimentales obtenidos para la conductividad, frente a la concentración de surfactante en la disolución

medida, nos permite obtener la concentración micelar crítica. Para ello, a la curva representada se le trazan las dos tangentes correspondiente a ambos tramos de la curva, y su intersección corresponderá a la concentración micelar crítica.

3.3.- Determinación de la Temperatura Crítica

Disoluciones de cada surfactante, conteniendo diferentes concentraciones del mismo, se colocan en un baño termostatzado y aumentándose la temperatura cada 10 min. Las diferentes disoluciones se mantienen en el baño hasta que se observa la aparición de turbidez en las mismas, considerándose la temperatura a la cual ocurre dicha turbidez como la temperatura de punto de nube para dicha concentración.

La determinación de la temperatura crítica para cada surfactante se obtiene representando gráficamente la temperatura de punto de nube frente a la concentración de surfactante en disolución. Trazando tangentes a la curva obtenida, la temperatura crítica vendrá dada por la temperatura correspondiente a la intersección de ambas rectas tangentes.

3.4.- Determinación cromatográfica

Las condiciones óptimas de separación para los diferentes analitos en estudio, se establecen inyectando mezclas de los mismos en el sistema cromatográfico. Se inyectan dos tipos de mezclas: unas que contienen PCBs, y otras PCDFs. La concentración de las muestras inyectadas es de 5.0×10^{-6} M, de forma que no aparezcan interferencias a la hora de establecer los diferentes picos correspondientes a cada uno de los analitos. Las condiciones se modifican hasta alcanzar una separación de los picos suficiente para poder realizar estudios cualitativos y cuantitativos.

Para establecer la separación óptima en cada caso, se ha trabajado con condiciones cromatográficas isocráticas, pero cuando se quiere obtener la

separación de los diferentes compuestos presentes en una mezcla donde se encuentran tanto PCBs como PCDFs, debe utilizarse condiciones de gradiente. El proceso es el mismo, pero se van cambiando los tiempos y composición de la fase móvil hasta obtener la separación de todos, o la mayoría, de los analitos estudiados.

La identificación de cada uno de los analitos para su posterior determinación, se realiza inyectando cada uno de ellos por separado y comparando el pico resultante con el correspondiente en la mezcla.

Una vez optimizada la separación, y caracterizado cada pico se realizaron las curvas de calibrado de cada analito en los diferentes medios micelares utilizados, preparando las disoluciones en matraces aforados de 10 ml, donde se añadía la cantidad de patrón de cada compuesto necesaria para alcanzar la concentración deseada, y enrasando posteriormente con el medio micelar. De la misma forma, se realizaron blancos para observar la existencia, o no, de interferencias debido a la presencia de los correspondientes surfactantes.

3.5.- Acondicionamiento de las muestras acuosas

Las muestras acuosas se acondicionan añadiendo la cantidad adecuada de cada analito, en función de la concentración final requerida y enrasándose con agua Milli-Q hasta alcanzar un volumen final de 10 ml. Estas muestras se agitan durante varios minutos para obtener una distribución homogénea de todo los analitos en el volumen de la misma. Una vez finalizado este proceso las muestras acuosas, junto con los diferentes analitos en estudio, están preparadas para su utilización en los diferentes estudios.

Las muestras de agua de mar se acondicionan de igual manera que las anteriores; se toman 4 ml. de muestra de agua de mar, a la cual se le añade el volumen correspondiente de cada analito para alcanzar la concentración requerida, y se enrasa con surfactante hasta los 10 ml. finales.

3.6.- Acondicionamiento de las muestras de sedimento

Previamente al lavado de la muestra, para eliminar posibles impurezas e interferencias, se procede a seleccionar el tamaño de partícula que será utilizada en los posteriores estudios. Para ello se pasa el sedimento a través de un tamiz de 150 μm . y se recoge la fracción inferior a este tamaño. Una vez seleccionada la fracción se procede a su limpieza con agua destilada.

Para el proceso de acondicionamiento de la muestra, se añaden cantidades de aproximadamente 1 g. de sedimento en un tubo de centrífuga de aproximadamente 10 ml., 1 ml. de agua Milli-Q por cada gramo de sedimento y finalmente volúmenes adecuados de cada analito para obtener la concentración deseada. Esta mezcla se coloca en un agitador rotativo durante 24 horas. Tras este periodo de acondicionamiento las muestras se centrifugan y se elimina el sobrenadante, donde se comprueba que no hay PCBs ni PCDFs. De esta forma la muestras de sedimento están preparadas para la extracción.

3.7.- Acondicionamiento de las muestras de organismos

Los organismos se separan de la concha, y tras su homogeneización mediante trituración, viales que contienen 2 ml. de la matriz resultante, se congelan a -80°C , durante 48 h.. Una vez transcurrido este tiempo se liofilizan, con lo que se consigue una muestra óptima para su acondicionamiento.

A las muestras liofilizadas, con un contenido de 2 g. cada una, se les añade 10 ml. de agua Milli-Q y una cantidad adecuada de los diferentes analitos en estudio, y se deja en un sistema rotatorio durante 24 horas para su acondicionamiento. Al igual que los sedimentos, tras el periodo en el sistema rotativo, se centrifugan y se elimina el sobrenadante. Tras este proceso las muestras quedan preparadas para ser sometidas al proceso de extracción.

3.8.- Extracción por Microondas

La muestra de 1 g. previamente acondicionada, bien de sedimento o de organismo, se pasa a los botes de teflón específicos del microondas, añadiéndose un volumen inicial de 10 ml. de la disolución de surfactante para la primera etapa de lavado. Una vez finalizada esta primera etapa, en la que se produce el acondicionamiento de la muestra y analitos al medio extractante, se centrifuga y se retira el medio micelar. La muestra se somete nuevamente a otro dos pasos de lavado añadiéndose cada una de las veces 5 ml. de la disolución de surfactante. El volumen final obtenido tras los tres pasos de lavado, se inyectará directamente en el sistema cromatográfico para la realización del correspondiente análisis.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Todos los resultados obtenidos en los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral permiten obtener las siguientes conclusiones:

1. Se ha comprobado que la metodología de "Extracción por Punto de Nube", optimizada para el caso de los PCBs y PCDFs, facilita en gran medida los procesos de extracción y preconcentración de analitos presentes en muestras acuosas. La aplicación de esta metodología requiere de un menor número de etapas que otras técnicas convencionales en las cuales se utilizan disolventes orgánicos. De aquí que se facilite el proceso y se reduzca el tiempo de análisis.
2. El estudio realizado con los diferentes medios micelares indica que la eficiencia del proceso de "Extracción por Punto de Nube" depende principalmente del tipo de surfactante utilizado como extractante.
3. La influencia de factores como el tiempo de equilibración, el volumen o concentración de surfactante añadido, y la adición de sales a la muestra, es distinta para cada medio micelar así como para los diferentes PCBs y PCDFs. Por tanto, cada uno de ellos debe ser optimizado en cada caso particular.
4. Los valores de recuperación obtenidos varían ligeramente en función del surfactante utilizado como extractante. Todos los surfactantes estudiados presentan recuperaciones altamente satisfactorias, salvo el Brij 56, en cuyo caso los porcentajes de recuperación son muy bajos.
5. Los resultados obtenidos al aplicar la metodología a muestra reales de agua de mar procedentes de diversas regiones y previamente acondicionadas con

los diversos PCBs y PCDFs, indican que la misma no se ve influenciada por las características fisicoquímicas de la muestra analizada.

6. La aplicación de la metodología de "Extracción por Punto de Nube" a muestras reales de agua de mar, presenta resultados similares a otras metodologías convencionales, como por ejemplo la extracción líquido-líquido. Es por tanto, que la "Extracción por Punto de Nube" puede considerarse como una metodología alternativa a las ya existentes, para la extracción y preconcentración de PCBs y PCDFs que se encuentran en muestras de agua de mar. Presenta además las ventajas de menor contaminación medioambiental debido a la no utilización de disolventes orgánicos, así como el menor coste y mayor sencillez.
7. La optimización de la metodología de Extracción Asistida por Microondas (MAE) requiere del estudio de la influencia que diversos parámetros tienen sobre el proceso. Se ha comprobado que, mientras factores tales como el pH de la disolución de surfactante utilizada o el volumen y concentración de la misma, no presentan una influencia notoria, otros parámetros, como son la potencia de extracción, el número de lavados y el tiempo de cada uno de ellos, presentan variaciones significativas en la eficiencia de la extracción.
8. Cuando esta metodología es aplicada a muestras reales de sedimentos marinos, las cuales presentan diferentes características de textura, tamaño de partícula y composición, los porcentajes de recuperación son considerablemente altos para los diferentes PCBs y PCDFs, independientemente del medio micelar utilizado.

Los resultados obtenidos mediante la aplicación de la metodología de "Extracción Asistida por Microondas" con surfactantes a muestras de

sedimentos marinos, son comparables a los resultados obtenidos en otros estudios llevados a cabo utilizando la misma técnica pero usando disolventes orgánicos como extractantes.

9. Cuando la metodología MAE es aplicada a muestras que contienen mezclas de PCBs y PCDFs conjuntamente, se observan variaciones en el comportamiento de los diferentes analitos con respecto al obtenido cuando se estudian ambas familias por separado. Esto puede ser debido a las interacciones que se establecen entre los diferentes analitos. En este caso, se obtiene una adecuada recuperación bajo las condiciones óptimas de MAE establecidas para el caso de los PCBs.
10. La metodología MAE, aplicada a muestras de organismos marinos, una vez que las mismas han sido acondicionadas con los PCBs y PCDFs, presenta variaciones importantes en función de los parámetros experimentales como son el tiempo de extracción de las diferentes etapas de lavado y el número de las mismas.
11. Los resultados obtenidos para los PCBs y PCDFs bajo las condiciones de extracción no presentan resultados satisfactorios respecto a los porcentajes de recuperación obtenidos, cuando el medio utilizado como extractante es el Genapol X-080. Es por esto que puede decirse que el Genapol X-080 no presenta las características adecuadas para ser utilizado como medio extractante en la metodología de MAE, cuando esta es aplicada para la determinación de PCBs y PCDFs presentes en organismos marinos.
12. En el caso del POLE, los porcentajes de recuperación obtenidos alcanzan valores satisfactorios. Así, podemos concluir que el POLE es un medio micelar adecuado para la extracción de PCBs y PCDFs presentes en

organismos marinos mediante la metodología de Extracción Asistida por Microondas.

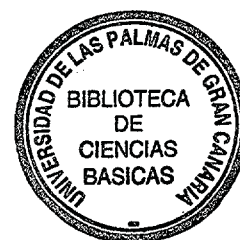
BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

1. Zebürh Y., Näf C., Bandh C., Broman D., Ishaq R. y Pettersen H., *Chemosphere*, 1993, 27(7), 1211
2. Zappoli S., Andracchio A. y Morselli L., *Chemosphere*, 1997, 35(8), 1729
3. Pavoni B., Salizzato M. y Volpi Ghirardini A., *Annali di Chimica*, 1998, 88, 189
4. Pramauro E. y Pelizzetti E., *Colloids and Surfaces*, 1990, 48, 193
5. Ganong B. R. y Delmore J.P., *Anal. Biochem.*, 1991, 193, 35
6. Böckelen A. y Niessner R., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1993, 346, 435
7. Day M.C., *Pure Appl. Chem.*, 1977, 49, 75
8. Hadjmohammadi M.R. y Fatemi M.H., *J. Liquid Chrom.*, 1995, 18(13), 2569-2578
9. Komaromy-Hiller G. y Von Wandruszka R., *Talanta*, 1995, 83
10. Samsonov D.P., Kiryukhin V.P., Zhiryukhina N.P. y Pervunina R.I., *J. Anal. Chem.*, 1996, 51, 1112
11. Pramauro E. y Prevot A.B., *Puere & Appl. Chem.*, 1995, 67(4), 551
12. Frank B. y Garoff S., *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1996, 116, 42
13. Mosler R. y Hatton A.T., *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 1996, 1, 540
14. Simonsick W.J. y Hites R.A., *Anal. Chem.*, 1986, 58, 2114
15. Flynn K.J. y Flynn K., *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1992, 89, 73
16. Edgar P.J., Davies I.M., Hursthouse A.S. y Matthews J.E., *Marine Pollution Bulletin*, 1999, 38(6), 486
17. García Pinto C., Pérez Pavón J.L., Moreno Cordero B., Romero Beato E. y García Sánchez S., *J. Anal. Atomic Spectrometry*, 1996, 11, 67

18. Ewald G., Bremle G. y Karlsson A., *Marine Pollution Bulletin*, 1998, 36(3), 222
19. Watanabe H. y Tanaka H., *Talanta*, 1978, 25, 585
20. Mesquita da Silva M.A., Azzolin Frescura V.L., Nome Aguilera F.J. y Cortius A.J., *J. Anal. Atomic Spectrometry*, 1998, 13, 1369
21. Fouco R., Colombini M.P., Ceccarini A. y Abete C., *Microchemical Journal*, 1996, 54, 384
22. Fava F., Marchetti L. y Quattroni G., *Annali di Chimica*, 1997, 87, 667
23. Johansen H.R., Becher G. y Greibrokk T., *Anal. Chem.*, 1994, 66, 4068
24. Larsen B. Bowadts S. y Facchetti S., *Inter.J.Environ.Anal.Chem.*, 1992, 47, 147
25. Ballschmiter K., *Pure & Appl. Chem.*, 1996, 68(9), 1771
26. Durfee R.L., Contos G., Whitmore F.C., Barden J.D., Hackman E.E. y Westin R.A., "PCBs in the United States - Industrial Use and Environmental Distributions", Preparado para la U.S. Environmental Protection Agency, Oficina de Sustancias Tóxicas, EPA 560/6-76-005, 1976
27. Hünerfuss H., Pfaffenberger B., Gehrcke B., Karbe L. Koning W.A. y Landgraff O., *Marine Pollution Bulletin*, 1995, 30(5), 332
28. Bergman A., Hagman A., Jacobsson S, Jansson B. y Ahlman M., *Chemosphere*, 1984, 13(12), 237
29. Wagner S.L., Durand L.R., Inman R.D., Kiigemagi U. y Deinzer M.L., *Environmental Contamination and Toxicology*, 1991, Technical Paper No. 9586, 596
30. Wang-Andersen G., Utne Skaare J., Prestrud P. y Steinnes E., *Environmental Pollution*, 1993, 82, 269
31. Wells D.E. y Echarri I., *Inter. J. Environ. Chem.*, 1992, 47, 75
32. Kuehl D.W., Butterworth B.C., Libal J. y Marquis P., *Chemosphere*, 1991, 22(9-10), 849

33. Funcke W., Balfanz E., Fuchs J., Luthardt P. y Theisen J., *Chemosphere*, 1993, 27(4), 555
34. Järnberg U., Asplund L., de Wit C., Grafström A., Haglund P., Jansson B., Lexén K., Strandell M., Olsson M. y Jonsson B., *Environ. Sci. Technol.*, 1993, 27, 1364
35. Sistovaris N., Donges U. y Dudek B., *J. High Resol. Chrom.*, 1990, 13, 547
36. Gianguzza A., Pelizzetti E. y Sammartano S., *"Marine Chemistry: An Environmental Analytical Chemistry Approach"*, Kluwer Academic Publishers, 1997
37. Rimkus G., Rexilius L., Heidemann G., Vagts A. y Hedderich J., *Chemosphere*, 1993, 26(6), 1099
38. Kimbrough R.D., *"Halogenated Biphenyls, Terphenyl, Naphtalenes, Dibenzodioxins and Related Products"*, Elsevier/North Holland Biomedical Press, New York, 1980
39. Erickson M.D., *"Analytical Chemistry of PCBs"*, Lewis Publishers, Michigan, 1992
40. Hutzinger O., Safe S. y Zitko V., Robert E., *"The Chemistry of PCBs"*, Krieger Publishing Company, Malabar, Florida, 1983
41. Morselli L., Setti L., Iannuccilli A., Spinozzi G., Dinelli G. y Quattroni G., *Annali di Chimica*, 1998, 88, 543
42. Long J.R. y Hanson D.J., *Chem. Eng. News*, 1983, 6, 25
43. Bumb R.R., Crummett W.B., Cutie S.S., Gledhill J.R., Hummel R.H., Kagel R.O., Lamparski L.L., Luoma E.V., Miller D.L., Nestrick T.J., Shadoff L.A., Stehl R.H. y Woods J.S., *Science*, 1980, 210, 385
44. Rappe C., *Environ. Sci. Technol.*, 1984, 18(3), 78A
45. Rappe C., *Pure & Appl. Chem.*, 1996, 68, 1781



46. Addis G. y Komai R.Y., *Mechanistic Aspects of the Thermal Formation of Halogenated Organic Compounds Including Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins*, Gordon and Breach Science Publishers, New York, 1983
47. Clement R.E., *Anal. Chem.*, 1991, 63, 1130
48. DoE, *Pollution Paper*, 1989, N° 27, 102
49. Firestone D., *Environ. Health Perspect.*, 1973, 5, 59
50. Fletcher C.L. y McKay W.A., *Chemosphere*, 1993, 26(6), 1041
51. Eitzer B.D., *Environ. Sci. Technol.*, 1993, 27, 1632
52. Kannan N., Tanabe S. y Tatsukawa R., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1988, 41, 267
53. Stephens R.D., Rappe C., Hayward D.G., Nygren M. Startin J., Esboll A., Carlé J. y Yrjänheikki J., *Anal. Chem.*, 1992, 64, 3109
54. Fleischer O., Wichmann H. y Lorenz W., *Chemosphere*, 1999, 39(6), 925
55. Bruckmann P., Hackhe K., König J., Theisen J., Ball M., Pöpke O., Kirschmer P., Mülder W., Rappe C. y Kjeller L.O., *Chemosphere*, 1993, 27(5), 707
56. Pyell U. y Garrigues P., *J. Chromatography A*, 1994, 660, 223
57. Ballschmiter K., Bacher R. y Mennel A., *J. High Resol. Chrom.*, 1992, 15, 260
58. Khasawneh I.M. y Winefordner J.D., *Talanta*, 1988, 35(4), 267
59. Hernández García J., Sosa Ferrera Z., Bermejo Martín-Lázaro A.J. y Santana Rodríguez J.J., *Mikrochimica Acta*, 1995, 118, 185
60. Nestruck T.J., Lamparski L.L. y Cramm R.H., *Chemosphere*, 1991, 22, 215
61. Kimata K., Hosoya K., Araki T., Tanaka N., Barnhart E.R., Alexander L.R., Sirimanne S., McClure P.C., Grainger J. y Patterson G., *Anal. Chem.*, 1993, 65, 2502

62. Moroi Y., *"Micelles: Theoretical and applied Aspects"*, Plenum Press, New York, 1992
63. Rosen M.J., *"Surfactants and Interfacial Phenomena"*, New York: Wiley Interscience, 1989
64. Moulik S.P., *Current Science*, 1996, 71(5), 368
65. Nagarajan R. y Ruckenstein E., *Separation Science and Technology*, 1981, 16(10), 1429
66. Hinze W.L., *"Organized Surfactant Assemblies in Separation Science"*, American Chemical Society, Chapter 1, 1987
67. Shinoda K., Nakagawa T., Tamamushi B. y Isemura T., *"Colloidal Surfactants"*, Acad. Press, New York, 1963
68. Armstrong D.W., *Separation y Purification Methods*, 1985, 14(2), 213
69. Fendler J.H., *"Membrane Mimetic Chemistry"*, Wiley, New York (1982)
70. Merdas A., Glinde M., Ober R., Nicot C. y Waks M., *J. Phys. Chem.*, 1996, 100, 15180
71. Kadam K.L., *"Enzyme Microb. Technol."*, 1986, 8, 266
72. Hatton T.A., *"Ordered Media in Chemical Separation"*, Hinze W.L. y Armstrong D.W., Eds., ACS Symp. Series-342, Am. Chem. Soc., Washington D.C., 1987
73. Menger F.M. y Bonicamp J.M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103, 2140
74. Wennerstrom H. y Lindman B., *Physics Reports*, 1979, 52, 2
75. Watarai H., *J. Chrom. A*, 1997, 780, 93
76. Oakenfull D., *"Aggregation Processes in Solution"*, Wyn-Jones E., Gormally J., Eds., Elsevier, New York, 1983, Chapter 5.
77. Winnik F.M. y Regismond S.T.A., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical & Engineering Aspects*, 1996, 118, 39
78. Lucy C.A. y Tsang J.S.W., *Talanta*, 2000, 50, 1283
79. Pelizzetti E. y Pramauro E., *Anal. Chim. Acta*, 1985, 169, 1

80. Cline Love L.J., Habarta J.G. y Dorsey J.G., *Anal. Chem.*, 1984, 56, 1132 A
81. Sanz-Medel A., Martínez P.L. y Díaz M.E., *Anal. Chem.*, 1987, 59, 774
82. Hernández García J., Sosa Ferrera Z., Bermejo Martín Lázaro A.J. y Santana Rodríguez J.J., *Analytical Letters*, 1994, 27(7), 1355
83. Pramauro E. y Pelizzetti, *Trends in Analytical Chemistry*, 1988, 7(7), 260
84. Laane C., Giovenco S., Dekker M., Baltussen J., Van't Riet K., Bijsterbosch B. y Veeger C., Abstract of Papers, Sixth international Symposium on Surfactants in Soln., New Delhi, India, August, 1986; Abstr. No AA35L, 265
85. Leser M.E., Wei G. y Luisi P.L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 135, 629
86. Goklen K.E. y Hatton T.A., *Biotechnol. Prog.*, 1985, 1, 69
87. Kadam K.L., *Enzyme & Microbial Techn.*, 1986, 8, 266
88. Armstrong D.W. y Stine G.Y., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1983, 3, 6220
89. Borgerding M.F. y Hinze W.L., *Anal. Chem.*, 1985, 57, 2138
90. Fernández Laespada M.E., Pérez Pavón J.L. y Moreno Cordero B., *Analyst*, 1993, 118, 209
91. Ferrer R., Beltrán J.L. y Guiteras J., *Anal. Chim. Acta*, 1996, 330, 199
92. Armstrong D.W. y Bui K.H., *J. Liq. Chrom.*, 1982, 5, 1043
93. Zhang Y. y El Rassi Z., *J. Liq. Chrom.*, 1995, 18(7), 3373
94. Taguchi K., Hiratani K. y Okahata Y., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1986, 364
95. Sepaniak M.J., Burton D.E. y Maskarinec M.P., *Anal. Chem.*, 1987, 59, 472
96. Pramauro E. y Bianco Prevot A., *Science & Technology*, 1998, 80, 733
97. Hinze W.L. y Pramauro E., *Critical Review in Analytical Chemistry*, 1993, 24(2), 133

98. Tani H., Kamidate T. y Watanabe H., *J. Chromatography A*, 1997, 780, 229
99. Quina H.H. y Hinze W.L., *Ind. Eng. Chem. Research*, 1999, 38(11), 4150
100. Sicilia D., Rubio S., Pérez-Bendito D., Maniasso N. y Zagatto E.A.G., *Anal. Chim. Acta*, 1999, 392, 29
101. Evans H., Tildesley D.J. y Leng C.A., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1987, 83(3), 1525
102. Huibers P.D.T., Shah D.O. y Katrizky A.L., *J. Colloid and Interface Science*, 1997, 193, 132
103. Frankewich R.P. y Hinze W.L., *Anal. Chem.*, 1994, 66, 944
104. Gu. T. y Galera-Gómez P.A., *Colloids and Surfaces*, 1995, 104, 307
105. Minatti E. y Zanette D., *Colloids and Surfaces*, 1996, 113, 237
106. Maclay W.N., *J. Colloids Science*, 1956, 272
107. Strey R., *Ver. Bunsenges. Phys. Chem.*, 1996, 100, 182
108. Nishikido N., *J. Colloid Interface Sci.*, 1990, 136, 401
109. Manohar C. y Kelkar V.K., *J. Colloids Interface Scien.*, 1990, 137(2), 604
110. Hinze W.L., *Ananli di Chimica*, 1987, 77, 167
111. Sirimanne S.R., Barr J.R., Patterson G. y Ma L., *Anal. Chem.*, 1996, 68, 1556
112. García Pinto C., Pérez Pavón J.L. y Moreno Cordero B., *Anal. Chem.*, 1995, 67, 2606
113. Komaromy-Hiller G. y von Wandruszka R., *Talanta*, 1995, 42(1), 83
114. Gotlieb I., Bozzelli J.W. y Gotlieb E., *Separation Sci. and Techn.*, 1993, 28(1-3), 793
115. Abdul A.S. y Gibson T.L., *Environ. Sci. Technol.*, 1991, 25, 665
116. Onuska F.I. y Terry K.A., *Chromatographia*, 1993, 36, 191

117. López-Avila V., Young R., Benedicto J., Ho Pauline, Kim R. y Beckert W.F., *Anal. Chem.*, 1995, 67, 2096
118. Ganzler K., Salgó A. y Valko K., *J. Chromatography*, 1986, 371, 299
119. Ganzler K., Sziavai I. y Salgó A., *J. Chromatography*, 1990, 520, 257
120. López-Avila V., Young R. y Beckert W.F., *Anal. Chem.*, 1994, 66, 1097
121. López-Avila V. y Young R., *Application of Microwave Energy to the extraction of Organic compounds from solid Samples*, EPA Report 600/R-94/031; U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring Systems Laboratory: Las Vegas, NV, 1994
122. Barnabas J.R., Fowles I.A. y Owen S.P., *Analyst*, 1995, 120, 1897
123. Vázquez M.J., Carro A.M., Lorenzo R.A. y Cela R., *Anal. Chem.*, 1997, 69, 221
124. Edwards D.A., Luthy R.G. y Liu Z., *Environ. Sci. Technol.*, 1991, 25, 127
125. Corti M., Minero C. y Degiorgio V., *J. Phys. Chem.*, 1984, 88, 309
126. Pramauro E., *Annali di Chimica*, 1990, 80, 101
127. Saitoh T. y Hinze W.L., *Talanta*, 1995, 2(1), 119
128. Hovarth W.J. y Huie C.W., *Talanta*, 1992, 39, 487
129. Gu T., Quin S. y Ma C., *J. Colloid & Interface Sci.*, 1989, 127, 586
130. Gu T. y Sjöblom J., *Colloids & Surfaces*, 1992, 64, 39
131. Schott H., Royce A.E. y Han S.K., *J. Colloid & Interface Sci.*, 1984, 98, 196
132. Hinze W.L., Singh H.N., Baba Y. y Harvey N.G., *Trends Anal. Chem.*, 1980, 52, 754
133. Sanz-Medel A., Martínez P.L. y Díaz M.E., *Anal. Chem.*, 1987, 59, 774
134. Bermejo A.J., Hernández J. y Santana J.J., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1992, 343, 509
135. Santana Rodríguez J.J., Hernández García J., Bernal Suarez M.M y Bermejo Martín-Lázaro A.J., *Analyst*, 1993, 118, 917

136. Bermejo Martín-Lázaro A.J., Hernández García J., Sosa Ferrera Z. y Santana Rodríguez J.J., *Analyst*, 1994, 119, 2241
137. Hernández García J., Bermejo A.J., Sosa Ferrera Z. y Santana Rodríguez J.J., *J. Anal. Chem.*, 1996, 354, 221
138. Lindsay S., "*High Performance Liquid Chromatography*", John Wiley and Sons Ed., 1992, pp. 71,72
139. Alder A.C., Häggblom M.M., Oppenheimer S.R. y Young L.Y., *Environ. Sci. Technol.*, 1993, 27, 530
140. Luckas B., Vetter W., Fischer P., Heidemann G. y Plötz J., *Chemosphere*, 1990, 21(1-2), 13
141. Chang R.R., Jarman W.M. y Hennings J.A., *Anal. Chem.*, 1993, 65, 2420
142. Hummert K., Vetter W. y Luckas B., *Chromatographia*, 1996, 42(5-6), 300
143. Fromme H., Otto T., Pilz K. y Neugebauer F., *Chemosphere*, 1999, 39(10), 1723
144. Alvarez Piñeiro M.E., Lozano J.S., Lage Yusty M.A. y Carril González-Barros S.T., *Talanta*, 1996, 43, 487
145. Murray A.P., Richardson B.J. y Gibbs C.F., *Marine Pollution Bulletin*, 1991, 22(12), 595
146. Musial C.J. y Uthe J.F., *J. Assoc. Anal. Chem.*, 1986, 69(3), 462
147. Mix M.C. y Schaffer R.L., *Marine Pollution Bulletin*, 1983, 14(3), 94
148. Hanus J.P., Guerrero H., Biehl E.R. y Kenner C.T., *J. Assoc. Anal. Chem.*, 1979, 62(1), 1979
149. Ackley K.L., B'Hymer C., Sutton K.L. y Caruso J.A., *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 1999, 14, 845

PUBLICACIONES

PUBLICACIONES

Los resultados obtenidos en los estudios realizados a lo largo del desarrollo de la presente Tesis Doctoral, han dado lugar a los siguientes trabajos científicos, aceptados o en espera de aceptación, en revistas científicas de carácter nacional e internacional:

- ❖ "CLOUD-POINT EXTRACTION AND PRECONCENTRATION OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS AND THEIR DETERMINATION USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY", *Química Analítica*, 17:45, 1998, 283-289
- ❖ "DETERMINATION OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY USING CLOUD-POINT EXTRACTION METHODOLOGY", *Analytica Chimica Acta*, 358, 1998, 145-155
- ❖ "APPLICATION OF CLOUD-POINT METHODOLOGY TO THE DETERMINATION OF POLYCHLORINATED DIBENZOFURANS IN SEA WATER BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY", *Analyst*, 124, 1999, 487-491
- ❖ "MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION OF ORGANO-CHLORINATED COMPOUNDS IN MARINE SEDIMENTS WITH ORGANIZED MOLECULAR SYSTEMS", *Chromatographia* (en prensa)

- ❖ **"DETERMINATION OF POLYCHLORINATED DIBENZOFURANS IN BLUE MUSSELS (*MYTILUS EDULIS*) USING MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION PRIOR TO HPLC-FLUORESCENCE DETECTION"**, *J. of Biological and Chemical Luminescence* (en prensa)

- ❖ **"APPLICATION OF MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION USING MICELLAR MEDIA TO THE DETERMINATION OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN MARINE SEDIMENTS"**, (enviado para su consideración como publicación en *Analytica Chimica Acta*)