

P10

EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA POR PAH MEDIANTE BIOMONITORIZACIÓN

Barroso, P.J.; Martín, J. (jbueno@us.es); Santos, J.L. (jsantos@us.es); Aparicio, I. (iaparicio@us.es); Alonso, E. (ealonso@us.es)
FQM344: Análisis Químico Industrial y Medioambiental

RESUMEN

En este trabajo se ha optimizado y validado un método analítico para la determinación de los dieciséis hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) clasificados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos, en hojas de naranjo amargo. El método propuesto se aplicó a la evaluación de la idoneidad de las hojas de naranjo como bioindicador de la contaminación urbana debido a estas sustancias. Se tomaron muestras en diez calles con diferente densidad de tráfico y en tres parques urbanos. Se detectaron catorce de los dieciséis PAHs. Las concentraciones medidas en las calles de alta densidad de tráfico fueron similares a las medidas en las calles de bajo tráfico. Las concentraciones medidas en las hojas tomadas en los parques fueron inferiores. Se emplearon las relaciones de diagnóstico para identificar y evaluar las posibles fuentes de emisión de estos contaminantes. Los resultados obtenidos señalan al tráfico como principal fuente de contaminación. Basándonos en estos resultados, la hoja de naranjo amargo parece ser un prometedor, además de económico, muestreador pasivo para la evaluación de la contaminación urbana debido a los PAHs.

Palabras clave: *Contaminación atmosférica, bioindicador, hojas de naranjo amargo, hidrocarburos aromáticos policíclicos.*

ABSTRACT

In this work an analytical method has been optimized and validated for the determination of the sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) classified as priority pollutants by United States Environmental Protection Agency (EPA), on bitter orange leaves. The method has been applied to the evaluation of the suitability of leaves of bitter orange tree as a bioindicator of urban atmospheric pollution by these contaminants. Leaves of bitter orange trees were collected from 13 sampling points in Seville city (South of Spain). Sampling points were located in high-density traffic streets (n=5), in low-density traffic streets (n=5) and in urban parks (n=3). Fourteen of the sixteen PAHs monitored were detected in bitter orange leaves. The concentrations in high-density traffic streets were similar to those in low-density traffic streets. Lower concentrations were found in leaves from parks. PAH diagnostic ratios were applied to identify and to assess pollution emission sources. Diagnostic

ratios obtained were consistent with traffic emissions as the main source of PAH to urban air. Based on the obtained results, leaves from bitter orange trees appears to be a promising inexpensive passive sampler for the evaluation of urban pollution due to PAHs.

Keywords: *atmospheric pollution, bioindicator, bitter orange leave, polycyclic aromatic hydrocarbon*

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son contaminantes orgánicos persistentes que se forman en procesos naturales (incendios forestales, erupciones volcánicas, etc.) y antropogénicos (plantas de producción y fundición de aluminio, hierro y acero, incineración de residuos, minería, refinación de petróleo, emisiones de vehículos de motor, etc.) como resultado de procesos de combustión incompleta (Xu et al, 2006). Estos contaminantes están catalogados como carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos (Straif et al, 2006) y muestran un papel importante entre las causas de riesgo de salud humana. Su presencia ha sido descrita por numerosos autores (Menichini et al, 2007) en el aire de la mayoría de las grandes ciudades. Estos estudios se han realizado mediante el análisis de aire que, si bien proporciona información útil acerca de su distribución en las fracciones inhalable, torácica y respirable, presenta algunas limitaciones, principalmente relacionados con la complejidad de la toma de muestras (fuentes difusas, meteorología, etc.) y las bajas concentraciones a las que los PAHs se encuentran en la atmósfera. Estas dificultades pueden ser superadas con el uso de organismos vivos como bioindicadores y bioacumuladores (Käffer et al, 2012). En este sentido, el uso de las hojas de los árboles como captadores pasivos de contaminantes atmosféricos constituye una interesante, además de rentable, alternativa para la evaluación de la contaminación atmosférica ya que, entre otras, elimina las dificultades que conlleva la toma de muestras de aire. Además, las especies de hoja perenne pueden utilizarse para evaluar la acumulación de contaminantes a través de la exposición a largo plazo, siendo una herramienta eficaz en la detección de posibles riesgos para la salud y el medio ambiente en las proximidades de las fuentes de emisión de contaminantes.

La bioacumulación de contaminantes en las hojas de los árboles puede ocurrir desde el aire (deposición atmosférica en plantas, especialmente en hojas) o el suelo (trasporte a través del xilema). Sin embargo, en el caso de los PAHs, esta última es menos significativa, debido al carácter lipófilo de estos compuestos, que dificulta el transporte a través del xilema.

Entre los árboles que se han empleado hasta la fecha como captadores pasivos de PAHs se encuentran pinos, ginkgos, eucaliptos y álamos (Rodríguez et al, 2012).

El naranjo amargo presenta algunas ventajas frente a estas especies. Se trata de un árbol de hoja perenne cuya altura es de 3 a 9 metros, lo que permite la acumulación del contaminante durante largos periodos de tiempo y facilita la toma de muestras. Además, se encuentra ampliamente distribuido en las ciudades, pudiéndose encontrar en zonas urbanas y suburbanas de la mayoría de las grandes ciudades,

especialmente en el sur de Europa. Por ello, esta especie puede ser idónea como bioindicador de la contaminación del aire y útil para un muestreo amplio en tiempo y espacio.

De acuerdo con ello, los objetivos de este trabajo fueron desarrollar una metodología analítica para la determinación de PAHs en hojas de naranjo amargo y evaluar la aplicabilidad de estas hojas como bioindicador de la contaminación por PAHs en el aire urbano.

METODOLOGÍA

Área estudiada y puntos de muestreo

La toma de muestras se realizó en trece puntos de la ciudad de Sevilla (Sur de España). Los puntos de muestreo se seleccionaron de acuerdo a los datos de tráfico durante el período 2006 a 2011 (<http://www.sevilla.org>). Se tomaron muestras de cinco calles con alta densidad de tráfico, cinco calles con baja densidad de tráfico, dos en parques urbanos y un parque a las afueras de la ciudad.

Las cinco calles con alta densidad de tráfico seleccionadas, fueron en orden creciente de tráfico: Puente Cristo de la Expiración (AT1), Paseo Colón (AT2), Torneo (AT3), Palmera (AT4) y Luis Montoto (AT5). Las cinco calles con baja densidad de tráfico fueron, en orden creciente de tráfico: El Greco (BT1), Ronda de Triana (BT2), Buhaira (BT3), Ciudad Jardín (BT4) y Asunción (BT5). Se seleccionaron los parques: Los Príncipes (P1), María Luisa (P2) y Alamillo (P3) situado éste en las afueras de la ciudad. Se tomaron muestras de al menos el 25% de los árboles presentes en las calles estudiadas. Se excluyeron del muestreo, los árboles con anomalías, gomosis o putrefacción en las raíces, infectados por virus o que presentaban parásitos. Por cada árbol muestreado se recogieron cinco hojas (una hoja de cada punto cardinal y otra del centro del árbol). El transporte al laboratorio se realizó en bolsas de plástico (25x30cm) con sello hermético. Una vez en el laboratorio, las muestras se cortaron, liofilizaron, trituraron y tamizaron a un tamaño menor a 1 mm.

Tratamiento de la muestra

Para la extracción de los PAHs se pesaron 0.5 g de hojas en un tubo de ensayo y se añadió 0.5 g de sulfato de sodio. La extracción por ultrasonidos se realizó empleando tres porciones consecutivas de 3 mL de acetona. Para cada extracción, se añadió el disolvente, se agitó en vortex durante 30 s, se introdujo en baño de ultrasonidos durante 10 min y se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min. El líquido sobrenadante se retiró a un tubo de ensayo y la fracción sólida se sometió de nuevo al proceso de extracción. Una vez reunidas las fracciones líquidas, se realizó una etapa de limpieza sobre el extracto mediante extracción en fase sólida dispersiva. Para ello, se añadieron 500 mg de C18, se agitó la mezcla durante 2 min y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. La fase orgánica se retiró a un tubo de ensayo y se evaporó a

sequedad empleando corriente de nitrógeno. El extracto seco se reconstituyó con 0.3 mL de metanol y se filtró a 0.45 μm .

Tabla 1: Longitudes de onda de excitación (λ_{ex}) y emisión (λ_{em}), recuperaciones, precisión (expresada como desviación estándar relativa, RSD), límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC) del método.

PAH		$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ (nm)	Recuperación (%)	RSD (%)	LD ($\mu\text{g}/\text{kg ms}$)	LC ($\mu\text{g}/\text{kg ms}$)
Naftaleno	Naf	280/330	63.0	6.1	0.57	1.88
Acenaftileno	AcPi	256*	74.4	9.8	2.13	2.40
Acenafteno	Ace	280/330	76.6	14.6	0.05	0.09
Fluoreno	Fl	280/330	71.4	3.5	0.10	0.97
Fenantreno	Fen	246/370	85.0	1.3	0.28	0.41
Antraceno	Ant	250/406	85.7	0.2	0.03	0.11
Fluoranteno	Flu	280/450	85.1	1.4	0.48	1.51
Pireno	Pir	270/390	82.4	4.0	1.50	2.33
Benzo[a]antraceno	BaA	265/380	26.6	4.2	3.03	4.98
Criseno	Cri	265/380	71.0	1.7	0.23	0.41
Benzo[b]fluoranteno	BbF	290/430	69.2	0.4	0.84	0.96
Benzo[k]fluoranteno	BkF	290/430	66.3	1.3	0.02	0.11
Benzo[a]pireno	BaP	290/430	62.1	0.7	0.73	0.81
Dibenzo[ah]antraceno	DahA	290/410	64.5	1.8	3.33	9.18
Benzo[ghi]perileno	BghiP	290/410	41.9	17.8	3.34	9.97
Indeno[123-cd]pireno	IcdP	300/500	48.7	8.4	5.62	6.07

Determinación cromatográfica

El análisis cromatográfico se realizó con un cromatógrafo de líquidos de la marca Agilent Technologies de la serie 1200, equipado con bomba binaria, inyector automático, desgasificador, compartimento termostatzado para la columna y detectores de fila de diodos (DAD) y fluorescencia (FI) situados en línea. Los analitos se separaron en una columna LiChrospher PAH empleando elución en gradiente con acetonitrilo (A) y agua (B) como fase móvil, un flujo de 1 mL/min y con una temperatura de columna de 30°C. El programa de elución fue el siguiente: 0-3 min, isocrático 60% de disolvente A; 3-15 min, gradiente constante desde 60% a 100% de disolvente A; 15-20 min, isocrático 100% de disolvente A. Se monitorizó un cromatograma ultravioleta (UV) usando una señal de UV a 254 nm. La cuantificación se realizó empleando la señal de fluorescencia obtenida a las longitudes de onda óptimas de excitación y emisión para cada uno de los PAH (Tabla 1). En el caso del acenaftileno (AcPi), no fluorescente, su determinación se realizó mediante UV. Las recuperaciones conseguidas con el proceso de extracción, así como la repetitividad y límites de detección y cuantificación se muestran en la Tabla 1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentraciones de PAHs en hojas de naranjo amargo.

Todos los compuestos estudiados, excepto el AcPi, BaP e IcdP, se encontraron en las hojas analizadas (Tabla 2). Las concentraciones de PAH en calles con alta densidad de tráfico (media del Σ PAH 205.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de materia seca (ms)) fueron similares a las medidas en calles con baja densidad de tráfico (202.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ms). Esto podría deberse a la geometría de las calles estudiadas: la mayoría de las calles de baja densidad de tráfico estudiadas son estrechas y con edificios de gran altura, y por tanto peor ventiladas que las calles con alta densidad de tráfico, lo que podría causar un efecto en la acumulación de los contaminantes en las calles de baja densidad de tráfico. Estas concentraciones fueron superiores a las encontradas en los parques (media 121.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ms).

Tabla 2: Rangos y concentraciones medias ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ms) de PAHs en hojas de naranjo amargo en calles con alta densidad de tráfico, baja densidad de tráfico y parques.

PAH	Calles con alta densidad de tráfico		Calles con baja densidad de tráfico		Parques	
	Rango	Media	Rango	Media	Rango	Media
Naf	<LC-9.45	6.84	<LC	<LC	<LC	<LC
AcPi	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC
Ace	0.44-0.63	0.53	0.52-3.12	1.20	0.29-0.56	0.44
Fl	1.28-2.70	2.12	1.94-5.28	3.83	1.24-1.52	1.36
Fen	30.3-43.6	37.3	19.1-29.1	24.7	21.6-22.6	21.9
Ant	2.07-3.15	2.53	1.50-2.27	1.86	1.21-1.79	1.51
Flu	12.8-17.3	14.9	9.38-16.4	12.8	8.56-9.29	8.90
Pir	27.1-32.0	29.2	22.8-35.6	29.6	14.6-16.9	15.9
BaA	57.6-128	93.4	100-150	124	43.0-75.0	54.2
Cri	0.98-2.83	1.75	1.12-22.3	6.02	<LC-1.14	0.95
BbF	1.03-1.68	1.50	<LC-1.63	1.29	<LC-1.13	1.05
BkF	0.42-0.83	0.66	0.49-0.88	0.69	0.14-0.41	0.28
BaP	<LC	<LC	<LOD-0.80	0.80	<LC	<LC
DahA	4.46-11.8	7.78	<LC-6.72	6.09	5.06-5.58	5.30
BghiP	<LC-18.4	<LC	<LC-5.95	<LC	<LC	<LC
IcdP	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC

Los PAHs que se encontraron a las mayores concentraciones fueron el BaA (96.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ms), Fen (28.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ms), Pir (26.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ms), y Flu (12.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ms) que además se detectaron en todas las muestras. Otros PAHs como Fl (media 2.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ms), Ant (2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ms), Ace (0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ms) y BkF (0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ms) se encontraron a menores concentraciones.

Influencia del tráfico urbano en la acumulación de PAHs

La influencia del tráfico urbano en la concentración de PAHs en las hojas de naranjo amargo se evaluó mediante un estudio estadístico de correlación multivariable. Para ello, se realizó un análisis de componentes principales empleando las concentraciones de PAHs medidas en las hojas como variables y los puntos de muestreo como casos. Los dos componentes principales obtenidos explican aproximadamente el 57 y 34% de la varianza (Figura 1). Como se observa en la Figura 2, se obtuvieron diferencias significativas entre los tres parques estudiados y las calles. Este hecho puede ser debido a la baja concentración de PAHs en parques. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias en los resultados obtenidos en las calles estudiadas. Esto podría deberse a que la concentración de PAH en el aire urbano no sólo depende de la densidad del tráfico, sino además de la morfología de las calles, que puede influir en la acumulación de PAH o incluso en la fotodegradación o sensibilidad con otras especies atmosféricas (Ravindra et al, 2008).

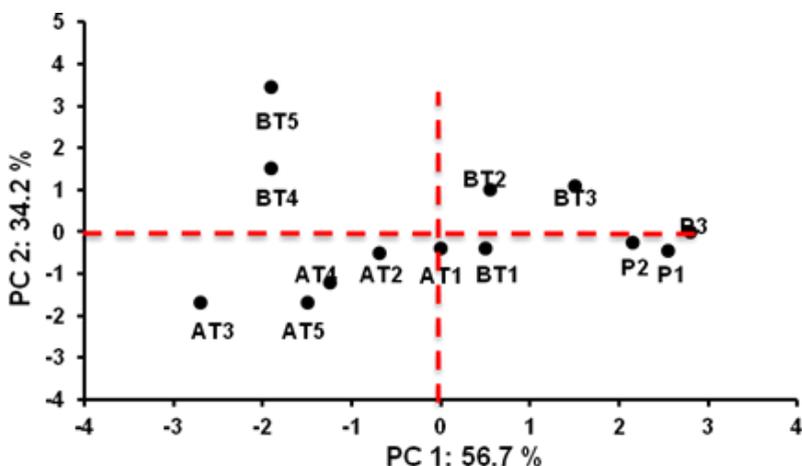


Figura 2. Análisis de componentes principales.

Fuentes de emisión de PAHs

A fin de evaluar la procedencia de la contaminación de PAHs en la ciudad de Sevilla, se emplearon las relaciones entre los PAHs individuales medidos en las hojas de naranjo (relación de diagnóstico). Estas relaciones asumen que la distribución de PAHs medidas en el medioambiente es característica de su fuente de emisión (Ravindra et al, 2008).

Se determinó la relación entre los PAHs de mayor y menor peso molecular $(AcPi + Ace + Fl + Fen + Ant)/(BaA + Cri + BbF + BkF + BaP + InP + DbA + BgP)$, así como el índice total $(Total\ index = Ant/(Ant + Fen)/0.1 + Flu/(Flu + Pir)/0.4 + BaA/(BaA + Cri)/0.2 + IcdP/(IcdP + BghiP)/0.5)$, de acuerdo con Barreca et al. (2014). Tanto la relación entre los mayores y menores pesos moleculares (0.26) como el índice total

(6.36) indican una posible fuente pirogénica (Barreca et al., 2014). Además, para cada muestra, se calcularon las siguientes relaciones de diagnóstico: $FI/(FI + Pir)$, $Flu/(Flu + Pir)$ y $BaA/(BaA + Cri)$ (Barreca et al. 2014; Tobiszewski y Katsoyiannis 2012; Yunker et al. 2002). La relación $FI/(FI + Pir)$ inferior a 0.5 es indicador de una emisión de gasolina, mientras que valores mayores a 0.5 indican emisión diesel (de la Torre-Roche et al. 2009). Los valores de $Flu/(Flu + Pir)$ inferiores a 0.4 señalan al petróleo como principal fuente, relaciones entre 0.4 y 0.5 se asocian con combustibles fósiles (vehículos y petróleo) (Pies et al. 2008; Ravindra et al. 2008) y relaciones mayores a 0.5 podrían indicar combustión de madera (de la Torre-Roche et al. 2009; Katsoyiannis et al. 2007). En el caso de la relación $BaA/(BaA + Cri)$, valores menores a 0.2 emisión procedentes del tráfico (Pies et al. 2008) y valores entre 0.2 y 0.35 combustión de carbón (Tobiszewski and Namiesnik 2012). En el caso de la relación $FI/(FI + Pir)$ y $BaA/(BaA + Cri)$ los valores obtenidos (0.09 y 0.98, respectivamente) podrían confirmar la emisión diesel y los valores de $Flu/(Flu + Pir)$, cercanos a 0.4 (media 0.37) podrían deberse a la combustión de combustibles fósiles.

Estas relaciones de diagnóstico coinciden con el hecho de que las emisiones de PAHs producidas por la emisión de gases de los vehículos son la principal fuente de contaminación del aire. A pesar de ello, las relaciones de diagnóstico deben utilizarse con precaución, ya que a menudo es difícil discriminar entre fuentes de contaminación y además, la sensibilidad de algunos PAH en la atmósfera pueden cambiar la relación de diagnóstico (Ravindra et al, 2008).

CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método analítico para la determinación de los 16 PAHs clasificados por la USEPA como contaminantes prioritarios en hojas de naranjo amargo. El método se basa en la extracción de los PAHs mediante ultrasonidos, limpieza empleando extracción sólida dispersiva y determinación por HPLC-DAD-FI. El método se aplicó a la determinación de PAH en hojas de naranjo amargo de las ciudad de Sevilla.

Se observaron concentraciones similares en todas las calles estudiadas y superiores a las medidas en los parques. Las relaciones de diagnóstico coinciden en que las emisiones de contaminación de PAH podrían deberse a emisiones procedentes de vehículos.

Este estudio muestra la adecuación de las hojas de naranjo amargo como bioindicador de la contaminación por PAHs en el aire urbano. Además, sirve como punto de partida para el empleo de este árbol como indicador de la contaminación debida a otros contaminantes en la atmósfera.

BIBLIOGRAFÍA

Barreca, S., Bastone, S., Caponetti, E., Martino, D.F.C., Orecchio, S. (2014). Determination of selected polyaromatic hydrocarbons by gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of wood to establish, the

- cause of dinking of an old vessel (Scauri wreck) by fire. *Microchemical Journal*. 117, 116-121.
- De la Torre-Roche, J.R., Lee, W.Y., Campos-Díaz, S.I. (2009). Soil-borne polycyclic aromatic hydrocarbons in El Paso, Texas: analysis of a potential problem in the United States/Mexico border region. *Journal of Hazardous Materials*. 163, 946-958.
- Käffer, M.I., Lemos, A.T., Apel, M., Rocha, J.V., Martins, S.M.A., Vargas, V.M.F. (2012). Use of bioindicators to evaluate air quality and genotoxic compounds in an urban environment in Southern Brazil. *Environmental Pollution*. 163, 24-31.
- Katsoyiannis, A., Terzi, E., Cai, Q.Y. (2007). On the use of PAH molecular diagnostic ratios in sewage sludge for the understanding of the PAH sources. Is this use appropriate? *Chemosphere*. 69, 1337–1339.
- Menichini, E., Acovella, N.I., Monfredini, F., Turrio-Baldassarri, L. (2007). Atmospheric pollution by PAHs, PCDD/Fs and PCBs simultaneously collected at a regional background site in central Italy and at an urban site in Rome. *Chemosphere*. 69, 422-434.
- Pies, C., Hoffmann, B., Petrowsky, J., Yang, Y., Temes, T.A., Hofmann, T. (2008). Characterization and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in river bank soils. *Chemosphere*. 72, 1594-1601.
- Ravindra, K., Wauters, E., Van Grieken, R. (2008). Variation in particulate PAHs levels and their relation with the transboundary movement of the air masses. *Science of Total Environment*. 396, 100–110.
- Rodríguez, J.H., Wannaz, E.D., Salazar, M.J., Pignata, M.L., Angmeier, A., Franzaring, J. (2012). Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in the tree foliage of *Eucalyptus rostrata*, *Pinus radiata* and *Populus hybridus* in the vicinity of a large aluminium smelter in Argentina. *Atmospheric Environmental*. 55, 35-42.
- Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Coglianò, V. (2006). Carcinogenicity of household solid fuel combustion and of high-temperature frying. *Lancet-Oncology*. 7, 977–978.
- Tobiszewski, M., Namiesnik, J. (2012). PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. *Environmental Pollution*. 162, 110-119.
- Xu, S.S., Liu, W.X., Tao, S. (2006). Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons in China. *Environmental Chemistry*. 40, 702-708.
- Yunker, M.B., Macdonald, R.W., Vingarzan, R., Mitchell, R.H., Goyette, D., Sylvestre, S. (2002). PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and compositions. *Organic Geochemistry*. 33, 489-515.