

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 120 número 17 del libro
correspondiente.

Sevilla,

19 OCT. 1987

El Jefe del Negociado de Tesis,

Isabel González

X/482

DETERMINACIÓN EN SUELOS DE COMPUESTOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS GENERADOS EN LA
COMBUSTIÓN DE BIOMASA



Memoria presentada para optar
al Grado de Doctor en Ciencias
Químicas por José Luis López Ruiz.

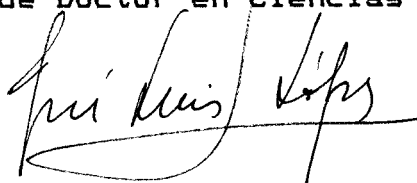


DETERMINACIÓN EN SUELOS DE COMPUESTOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS GENERADOS EN LA COMBUSTIÓN DE BIOMASA

por

José Luis Lopez Ruiz

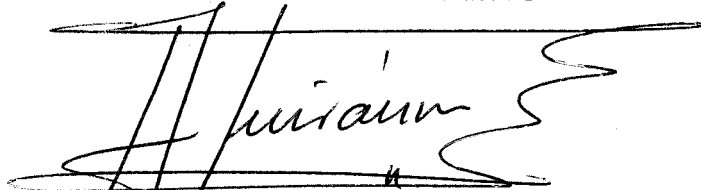
Memoria presentada para optar al
Grado de Doctor en Ciencias Químicas



Fdo.: José Luis Lopez Ruiz
Licenciado en Ciencias Químicas

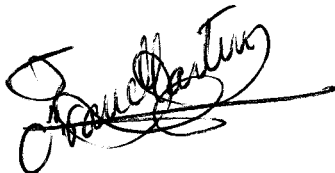
Visado en Sevilla, Septiembre de 1987

El Catedrático Ponente

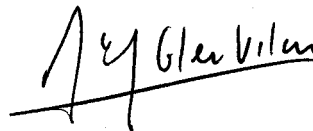


Fdo.: Alfonso Guiraum Pérez
Catedrático de Química Analítica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad de Sevilla

Los Directores



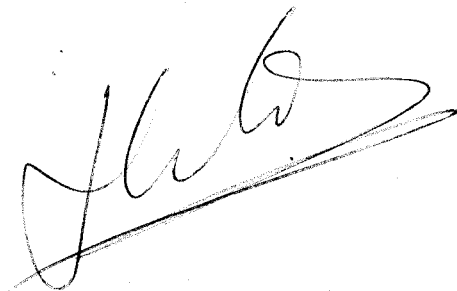
Fdo.: F. Martín Martínez
Profesor de Investigación
del C.S.I.C.



Fdo.: F.J. González Vila
Colaborador Científico
del C.S.I.C.

PROFESOR DOCTOR D.JOSE MARTIN ARANDA, DIRECTOR DEL INSTITUTO
DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA, DEL CONSEJO
SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

CERTIFICA: Que la memoria de investigación titulada
"Determinación en suelos de compuestos policíclicos
aromáticos generados en la combustión de biomasa", que
presenta D.José Luis López Ruiz para optar al Grado de
Doctor en Ciencias Químicas, ha sido realizada en la U.E.I.
de Bioquímica y Microbiología de este Instituto, bajo la
dirección de los Dres. F.Martín Martínez y F.J. González
Vila, reuniendo todas las condiciones exigidas a los
trabajos de Tesis Doctoral.



Sevilla, 24 de Junio de 1987

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas:

Al Prof. Dr. D. Alfonso Guiraum Pérez por su gentileza en actuar de Ponente de esta Tesis.

Al Prof. Dr. D. José Martín Aranda, Director del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, C.S.I.C., por las facilidades dadas para la realización del presente trabajo.

A los Dres. D. Francisco Martín Martínez y D. F.J. González Vila, directores del trabajo, y sin cuya continua orientación y enseñanza no se hubiera realizado el mismo. A ambos les agradezco su inestimable ayuda en la elaboración y discusión de los resultados, así como su amistad y constante estímulo.

Al Dr. D. M. Menéndez Gallegos del Instituto de Toxicología por la ayuda prestada en la realización de espectros de masas y al Dr. D. R. Sarmiento Solis por las medidas de cromatografía de líquidos.

A Dña. Trinidad Verdejo y Dña. Elena de Blas por su valiosa ayuda técnica durante el desarrollo de este estudio.

A todos los compañeros del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla que de una manera u otra contribuyeron a la realización de este trabajo.

ÍNDICE

| | pag. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| I. Objetivos e interés de los mismos | 1 |
| II. Introducción | 6 |
| II.1. Naturaleza de los compuestos policíclicos aromáticos en el medio ambiente y su nomenclatura | 7 |
| II.2. Introducción de CPA en la Naturaleza | 9 |
| II.3. Impacto medioambiental | 15 |
| II.4. Análisis de CPA | 17 |
| II.4.1. Toma y preparación de las muestras | 18 |
| II.4.2. Extracción, purificación y concentración de los extractos de CPA | 21 |
| II.4.3. Separación e identificación de CPA en mezclas complejas | 25 |
| III. Material y métodos | 29 |
| III.1. Descripción de las muestras y criterios adoptados para la selección de las mismas | 30 |
| III.2. Preparación de las muestras para el análisis y determinación de la materia orgánica de las mismas | 35 |
| III.3. Métodos de extracción y concentración de CPA | 36 |

| | pag. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| III.4. Evaluación con sustancia modelo de la eficacia de los diferentes métodos | 41 |
| III.4.1. Métodos de fraccionamiento y purificación | 43 |
| III.4.2. Técnicas de separación e identificación | 44 |
| III.4.3. Evaluación de los protocolos descritos | 46 |
| III.5. Separación, identificación y cuantifica- ción de CPA en las muestras | 47 |
| IV. Resultados y discusión | 52 |
| IV.1. Evaluación de métodos | 53 |
| IV.1.1. Procedimientos de fraccionamiento y purificación de los extractos | 54 |
| IV.1.2. Técnicas de separación e identificación | 58 |
| IV.1.2.1. Elección de condiciones cromatográficas. Re- producibilidad entre cromatogramas de FID e ión total | 61 |
| IV.1.3. Evaluación de diferentes protocolos | 64 |
| IV.1.4. Aplicabilidad del protocolo elegido a las muestras estudiadas | 68 |
| IV.1.5. Evaluación de los métodos de identificación de los componentes individuales de las mues- tras | 73 |
| IV.2. Contenidos en materia orgánica, material lipídico y CPA de las muestras | 76 |

| | pag. |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| IV.3. Naturaleza de los CPA de las muestras. Origen de los diferentes tipos de CPA e hipótesis sobre sus vías de formación | 85 |
| IV.3.1. Incendios de masas forestales de pino | 87 |
| IV.3.2. Incendio de rastrojera de cereal | 117 |
| IV.3.3. Hogueras de biomasa de pino y olivo | 122 |
| IV.3.4. Hornos de producción de carbón vegetal de pino, alcornoque y eucalipto (tierras de cubierta y carbones) | 130 |
| | |
| V. Conclusiones | 146 |
| | |
| VI. Bibliografía | 152 |

**I. OBJETIVOS E INTERÉS
DE LOS MISMOS**

Los compuestos policíclicos aromáticos (CPA) constituyen una importante clase de polutantes químicos ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Algunos de ellos figuran específicamente en las listas de contaminantes prioritarios de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de EEUU y de la Organización Mundial de la Salud por su directa incidencia en la salud humana, ya que se ha demostrado en algunos y se presume en otros su carácter de sustancias mutagénicas y/o carcinogénicas.

Por esta razón, crece cada día el interés científico por la identificación y cuantificación de CPA en todo tipo de muestras ambientales, y por el conocimiento tanto de sus procesos naturales o artificiales de formación como de las vías de introducción en la naturaleza.

Un tema de indudable actualidad relacionado con este tipo de estudios es la creciente frecuencia y magnitud de los incendios controlados o no de masas vegetales, ya que la combustión de biomasa que se produce en los mismos constituye una de las principales fuentes reconocidas de CPA.

Como es sabido, el fuego ha constituido a lo largo de muchos milenios un factor ambiental decisivo en el desarrollo y estado de evolución actual de los ecosistemas mediterráneos. Sin embargo, en las últimas décadas se ha producido una intensificación sin precedentes en el número de incendios forestales y en la extensión de las áreas afectadas. Los datos aportados por el Instituto para la

Conservación de la Naturaleza (ICONA) que recoge el último informe general sobre el Medio Ambiente en España, muestran que en el periodo 1981-1985 ardieron un total de 1.144.000 hectáreas de zona arboladas y desarboladas. Sólo en 1985 se quemaron en nuestro país 469.425 hectáreas (178.288 hectáreas eran de bosques), ocasionando pérdidas que superaron los 50.000 millones de pesetas. En Andalucía se vieron afectadas por el fuego, ese mismo año, 20.200 hectáreas de superficie forestal, a las que hay que sumar unas 30.000 hectáreas de superficie sometida a la quema controlada de rastrojera de cereal, que suponen en conjunto del 15 al 20% del total de superficie incendiada en todo el país.

Al margen de las graves repercusiones económicas y ambientales inmediatas y de las muchas interrogantes que se plantean sobre los efectos a largo plazo, que empiezan a merecer hoy día adecuada atención, un aspecto de las consecuencias de los incendios, de la combustión de biomasa en general, que no ha sido prácticamente abordado hasta ahora en España es el de la determinación cualitativa y cuantitativa de los CPA emitidos en dicho proceso.

Por todo ello, el presente estudio se planteó como objetivos : 1) la evaluación del impacto sobre el suelo soporte de CPA generados en incendios incontrolados y en la quema controlada de rastrojeras, y 2) el conocimiento de las posibles vías de formación a partir de precursores naturales de los compuestos detectados, seleccionando para tal fin una serie de casos puntuales de combustión de biomasa (hogueras

y hornos de producción de carbón vegetal) en los que fuera posible la identificación del máximo número de compuestos de este tipo.

Un problema asociado al estudio de CPA en muestras ambientales, independientemente de su origen, es el de su aislamiento y cuantificación. De hecho, los CPA sólo constituyen en conjunto una fracción muy pequeña del total de la materia orgánica de estas muestras, y en matrices complejas, como el suelo, se encuentran además formando parte de mezclas heterogéneas de componentes muy diversos. Esta circunstancia ha obligado a la continua adecuación de métodos de extracción, enriquecimiento y detección particulares en función de los crecientes progresos experimentados en la metodología de fraccionamiento y purificación de extractos y en las técnicas instrumentales de análisis. En base a estas consideraciones, y como objetivo previo al logro de los otros dos anteriormente expuestos, en el presente trabajo se contempló, ante todo, la necesidad de seleccionar la metodología más idónea, entendiendo por tal la que conjugara rapidez, economía y fiabilidad, para el estudio de nuestras muestras, una vez revisada la extensa bibliografía existente sobre métodos de detección de CPA en muestras de interés ambiental.

En resumen, pues, los objetivos del presente estudio se concretan en los siguientes puntos :

- 1) Determinación de perfiles cualitativos y cuantitativos de CPA generados en la combustión de material

vegetal en muestras de suelos y carbones.

2) Establecimiento de vías térmicas de formación de CPA a partir de precursores biogénicos.

3) Proposición de un protocolo de extracción, purificación, concentración y análisis de CPA, versátil y reproducible, aplicable a las muestras seleccionadas.

II. INTRODUCCIÓN

II.1. Naturaleza de los compuestos policíclicos aromáticos en el medio ambiente y su nomenclatura .

Se denominan compuestos policíclicos aromáticos (CPA) a aquellos constituidos por dos o mas ciclos, normalmente de seis carbonos pero también de cinco y de cuatro, con al menos una estructura bencenoide y el máximo de dobles enlaces no acumulados . Esta denominación genérica es la que se emplea en la literatura sobre la incidencia de estos compuestos en el medio ambiente , sin mencionarse consideraciones estructurales teóricas o hacerse agrupaciones por propiedades químicas. El criterio de clasificación empleado se basa exclusivamente en la composición elemental, y así , se habla de hidrocarburos , de compuestos con heteroátomos (O , S , N) incorporados a su estructura aromática o formando parte de radicales sustituyentes , o de compuestos hidroaromáticos cuando se trata de situaciones parcialmente hidrogenadas de cualquiera de los casos anteriores (Giger y Blumer , 1974 ; Konlg et al , 1983 ; Grimmer et al , 1983 ; White et al , 1984 ; Wozniak y Hites , 1985) . En conjunto , pues , existe una gran diversidad de compuestos bajo la denominación de C.F.A. , lo que constituye un condicionante importante para cualquier tratamiento genérico de los mismos . Sólo de forma puntual y al estudiar algún aspecto concreto , como por ejemplo el orden de elución de isómeros en cromatografía gaseosa , se hace referencia a criterios

estructurales y se habla de compuestos catacondensados , en los que los carbonos terciarios pertenecen a dos ciclos comunes , y de pericondensados en los que los carbonos terciarios pertenecen a mas de dos ciclos comunes , pero siempre de una forma descriptiva sin entrar en puntualizaciones de carácter teórico (Beernaert,1979).

Sin embargo , la diferente naturaleza estructural de los C.P.A. tiene importantes implicaciones. Así , resaltaremos , en primer lugar , que la actividad mutagènica y/o cancerígena de estos compuestos depende de su estructura molecular, y por ejemplo,entre los isómeros de masa molecular 228 sólo son cancerígenos benz(a)antraceno , criseno y benzo(c)fenantreno . Asimismo , la presencia de un radical alquílico en una posición determinada puede modificar dicha actividad ya que 5,metil-criseno es un cancerígeno mucho mas poderoso que todos sus homólogos (Lee y Wright,1980) . Aunque se han realizado intentos de correlación entre capacidad oncogènica y estructura , todavía existen numerosas irregularidades y aún es preciso seguir con planteamientos empíricos para evaluar la capacidad oncogènica de un determinado compuesto (Rouvray,1986) . En segundo lugar , el amplio margen de puntos de ebullición de estas sustancias,desde 178 °C de indano hasta 525°C de coroneno , es un factor que condiciona tanto la forma de muestreo de una posible fuente de C.P.A. (Warman,1983) como la técnica de identificación y cuantificación necesaria (Snook et al,1979). No obstante, existe una amplia bibliografía sobre aspectos estructurales

y propiedades fisico-químicas de los C.P.A. (Badger , 1969 ; Nielsen , 1981 ; Zander , 1983) , que por su extensión no reproducimos , y de la que haremos uso en distintas ocasiones a lo largo del presente trabajo .

En cuanto a la nomenclatura usada en la bibliografía sobre C.P.A. , existe la típica confusión que se da en la química de los productos naturales , es decir la utilización simultánea de los nombres históricos y los recomendados por la I.U.P.A.C..En nuestro caso, se emplearán los nombres clásicos citando entre paréntesis la nomenclatura sistemática cuando aparezcan por primera vez.

II.2. Introducción de C.P.A. en la naturaleza .

El estudio de la incidencia de los compuestos policíclicos aromáticos en la naturaleza comienza en la década de los cuarenta al ser detectados en un extracto de suelo rural (Kern , 1947) . Sin embargo , hasta los años sesenta no comienzan a plantearse hipótesis globales sobre la presencia de estos compuestos en el medio natural (Hangebrauck et al , 1967) . Actualmente se admite que hay dos vías genéricas de introducción de C.P.A. en la naturaleza : la combustión de sustratos orgánicos ocasionada por la acción antropogénica y los fenómenos naturales (Wakeham et al , 1980) , y ha quedado superada .

la polémica que atribuye la presencia de los C.P.A. a la acción exclusiva de una de las dos vías mencionadas (Ciusa y Morgante , 1980) . Sin embargo , hay casos en los que no se ha podido dilucidar el origen de algunos compuestos concretos en determinados sustratos como , por ejemplo , benzopirenos en asbestos o fluoranteno y piceno en minerales de mercurio (Youngblood y Blumer , 1975) .

La acción antropogénica se ocasiona fundamentalmente en la combustión incompleta de sustratos orgánicos en las actividades agrícolas , urbanas y/o industriales . Las principales situaciones que actúan como focos o fuentes de C.P.A. se resumen a continuación :

1. Instalaciones fijas de combustión

a) de calefacción doméstica

con combustibles fósiles

con materia vegetal

b) industriales

de producción de coque y asfalto

metalúrgicas

refinerías petrolíferas

c) centrales térmicas de producción eléctrica

con derivados petrolíferos

con carbón

d) incineradores de residuos

urbanos

industriales

2. Instalaciones móviles de combustión.

Tráfico rodado , marítimo y aéreo.

3. Acciones ocasionales .

a) incendios forestales

b) hogueras y hornos de producción de carbón vegetal .

c) quema de residuos agrícolas

rastrojeras de cereal

restos de la poda de árboles

limpieza de matorral

d) vertidos petrolíferos e industriales

Aunque la importancia de los distintos focos varia en función de los índices de desarrollo industrial , costumbres y usos culturales , hay una serie de hechos unánimemente aceptados : 1) el uso de los combustibles fósiles como fuente energética ha contribuido notablemente al incremento de los C.P.A. en la naturaleza , especialmente en las zonas mas densamente pobladas e industrializadas (Windsor y Hites , 1979) 2) los combustibles utilizados en las instalaciones fijas , especialmente el fuel-oil , contribuyen en mayor grado a dicho incremento (Otha et al , 1983) y 3) la combustión de materia vegetal es la fuente prioritaria de estos compuestos en el medio rural (Blumer y Youngblood , 1975) . No obstante , la aceptación de estos hechos no significa que todos los C.P.A detectados en un sustrato se originen de la misma forma sino que normalmente provienen del concurso de varias fuentes antropogénicas y algunos fenómenos naturales , y por eso se dice

frecuentemente en la literatura que el origen de los C.P.A. presentes en una muestra , especialmente en las sedimentarias , constituye un puzzle de difícil solución ya que sólo se dispone de datos para determinar la fuente concreta de algunos tipos de estos compuestos (Tan y Heit , 1981).

Es un hecho experimentalmente comprobado que el tipo de materia orgánica combustionada y la temperatura a la que se realiza la combustión determinan tanto la naturaleza de los componentes mayoritarios como sus vías de formación (Laflamme y Hites , 1978) . Así, por ejemplo , en las instalaciones fijas de combustión de sustancias carbonadas fósiles , que normalmente operan a temperaturas del orden de 1000 a 1200°C , se produce una mezcla de C.P.A. pobre en derivados alquílicos como consecuencia de la pirólisis de los n-alcanos (Blumer , 1976) . Sin embargo , las diferentes condiciones tecnológicas en las que se realiza la combustión así como los diferentes combustibles empleados pueden hacer variar algunos de los componentes mayoritarios emitidos (Lunde y Bjorseth , 1977) , por lo que resulta difícil reconocer el perfil de C.P.A. característico de una fuente polutante concreta . No obstante , existen parámetros que permiten asociar la presencia de algunos de estos compuestos con fenómenos específicos , antropogénicos y/o naturales , tales como la relación metilfenantrenos / fenantreno que indica su origen en la combustión de materia carbonada fósil o la concentración de perileno en sedimentos de edades

diferentes indicativas de su formación diagenética (Wakeham et al , 1980).

La combustión de la materia vegetal se realiza a temperaturas medianas , 300 a 600 °C , generándose una mezcla de C.P.A. rica en derivados alquílicos mediante procesos de aromatización de sustancias existentes en la materia vegetal y de pirólisis de alcanos análoga a la producida en la combustión de materia carbonada fósil (Blumer y Youngblood , 1975). Así, por ejemplo , se ha atribuido la presencia de cadaleno (1,6-dimetil,4-isopropil naftaleno) y eudaleno (1-metil,6-isopropilnaftaleno) a la aromatización térmica de los sesquiterpenos vegetales o la del reteno a la degradación térmica del ácido abiético (Simoneit y Mazurek , 1982). Sin embargo , la complejidad de los procesos de un incendio , donde coexisten fenómenos de combustión y pirólisis , son diversos los sustratos incendiados y muy variables las condiciones en que se producen , hace que todavía no estén definidas las características de los perfiles de C.P.A. emitidos para la mayoría de las situaciones en las que se produce combustión de materia vegetal (Ramdahl , 1983). Estas circunstancias ponen de manifiesto la conveniencia de estudiar de forma individualizada cada posible fuente de C.P.A. para conocer su incidencia en el medio ambiente .

En cuanto a la formación de C.P.A. atribuida a fenómenos naturales , cabe citar en primer lugar la actividad biosintética. Se dispone de datos que parecen sugerir que ciertos microorganismos , hongos , algas y bacterias , son capaces de sintetizarlos (Knorr y Schenk ,

1967 ; Mallet y Tissier , 1969) o que al menos son metabolitos (Ciusa y Morgante , 1980) . Sin embargo , algunos autores sostienen que los seres vivos no los sintetizan sino que los acumulan (Hare y Hites , 1976).

En segundo lugar , el hecho que los sedimentos antiguos y los petròleos contengan mezclas complejas de C.P.A. hace que sea indiscutible considerar la evolución catagènica y diagènica de la materia orgànica como fuente natural de estos compuestos (Tissot y White , 1978) . La dispersiòn de los sedimentos antiguos o las fugas de petròleos de sus bolsas de almacenamiento podría explicar la presencia de tales compuestos en sitios inesperados (Wakeham et al , 1980) .

En tercer lugar , la diagènesis ràpida de precursores biològicos , terrestres o acuàticos, està ampliamente aceptada como fuente de algunas series de compuestos : perileno , reteno , pimantreno , compuestos de estructura pimarano , tetra y pentaciclos derivados de triterpenos y esteroides (Wakeham et al , 1980 ; Tan y Heit , 1981 ; Rullkotter et al , 1984).

La diversidad de orìgenes de una misma serie de compuestos así como la coexistencia en un sustrato de compuestos generados "in situ " y de los provenientes de la dispersiòn hace que los C.P.A. no se puedan considerar como marcadores biològicos de procesos específicos , y de ahì que para determinar la causa de su presencia en muestras concretas se tenga que recurrir a estudios diferenciales con sustratos testigos . Así, por ejemplo , en el caso de los

sedimentos , para determinar los C.P.A. generados con el uso de los combustibles fósiles se realizan estudios comparativos de muestras en las que hay constancia de contaminación urbana e industrial con las que no están contaminadas (Tan y Heit , 1981) o bien para distinguir compuestos pirogénicos y diagenéticos se comparan sedimentos de épocas anteriores y posteriores al uso intensivo de tales combustibles (Wakeham et al, 1980)' .

II.3. Impacto medioambiental.

La ubicuidad de los C.P.A. en el medio ambiente es consecuencia de numerosos factores , de los que podemos resaltar : 1) el uso generalizado y constante a lo largo del tiempo de la combustión de sustancias carbonadas como fuente energética 2) la capacidad de dispersión de los compuestos generados bien por transporte eólico o en el arrastre del ciclo del agua en la naturaleza 3) la persistencia de dichos compuestos en materiales sedimentarios como consecuencia de escasa biodegradabilidad (Sirvins y Traimier , 1986) y 4) su capacidad de penetración en los organismos vivos , incorporándose a su metabolismo o acumulándose en ellos (Vassilaros et al , 1982 ; Krahn et al , 1982) . Por todo ello , la incidencia de estos compuestos es prácticamente universal tanto en el medio terrestre como en el acuático , con especial significación en las zonas densamente pobladas y/o

industrializadas (Shinohara et al , 1980).

En la literatura , la evaluación del impacto contaminante se plantea de manera diversa . Unas veces se enfoca en la evaluación de zonas muy restringidas , como , por ejemplo , el ambiente de trabajo de instalaciones industriales (Bjorseth y Eklund , 1979) o las proximidades a incineradores de residuos (Hrudehy et al , 1974) . Otras veces , se pretende evaluar zonas geográficas concretas como , por ejemplo , el ambiente de una ciudad y su área de influencia (Windsor y Hites , 1979) . Sin embargo , el método usado es siempre el mismo : muestrear las tres fases básicas de la introducción de C.P.A. en el medio natural , es decir , los posibles medios de transporte , aire y agua , los previsibles materiales de acumulación, polvo de ciudad, lodos , compost de basuras , suelos y sedimentos , y los residuos en los que pueda detectarse fenómenos de biodegradación o descomposición (Martens , 1982) . No obstante , la complejidad de los fenómenos de transporte , acumulación y biodegradación en la naturaleza hace que sea muy difícil delimitar la representatividad de una muestra , ya que , con frecuencia , un determinado sustrato forma parte de otro como , por ejemplo , el agua de lluvia que incorpora compuestos procedentes del material particulado del aire y a su vez los añade a los componentes de las aguas de un río (Shinohara et al , 1980).

Una limitación importante de los estudios del impacto contaminante de los C.P.A. es que su dispersión esta condicionada por los agentes atmosféricos y las estaciones

del año , siendo en general mas intensa en invierno (Melgarejo et al , 1986) , con independencia de las características de los compuestos generados en una fuente polutante concreta . Este hecho puede provocar intermitencias en el contenido cuantitativo de las muestras atribuibles a la situación atmosférica en el momento del muestreo (May y Wise , 1984).

Por último , la enorme variedad cualitativa y cuantitativa de los sustrato estudiados hace que en la mayoría de los trabajos sobre la incidencia de C.P.A. en el medio natural se restrinjan a determinados compuestos definidos como polutantes prioritarios y no a la globalidad de los compuestos generados (Chapman et al , 1982)

El conjunto de estos datos justifica que en la literatura se planteen fundamentalmente estudios parciales bien sobre determinados tipos de C.P.A (Kong et al , 1983) o sobre procesos específicos (White et al , 1979).

II.4. Análisis de C.P.A.

Los compuestos policíclicos aromáticos se encuentran en concentraciones muy pequeñas en la mezcla compleja de sustancias que constituye la materia orgánica de los sustratos , y forma parte de lo que en términos genéricos se denomina fracción lipídica del contenido orgánico de las muestras. La diversidad de sustratos en los que se detectan C.P.A. hace que tanto las características generales

de los mismos , materia orgànica y fracciòn lipídica extraída , como el contenido gobal y de componentes individuales de C.P.A. en las muestras sea muy variable . Así, por ejemplo , los sedimentos recientes del Mediterràneo tienen un contenido global de compuestos policíclicos de 0,6 a 0,8 microgramos / gr de muestra seca mientras que algunos sedimentos lacustres presentan concentraciones de 50 a 200 microgramos / gr (Burns y Villeneuve , 1983 ; Wakeham et al , 1980) . Igualmente son distintos los contenidos globales en C.P.A. de un suelo rural , 0,5 a 0.7 microgramo / gr , de los de un suelo de bosque amazònico en donde solo se detectan trazas de algunos compuestos (Laflamme y Hites , 1978) . Sin embargo la variabilidad del contenido global en C.P.A. no solo està afectada por el tipo de muestra sino tambien por circunstancias geogràficas y/o ambientales , y así , por ejemplo , el material particulado del aire de Europa occidental tiene contenidos veinte veces superiores al de Noruega (Lunde y Bjorseth , 1977) . Estos hechos condicionan el diseño del procedimiento analítico empleado, ya que la idoneidad de la purificaciòn y enriquecimiento del extracto de los C.P.A. y su identificaciòn y cuantificaciòn viene determinada por la naturaleza de la muestra y las concentraciones previsibles de los compuestos buscados . En este sentido , se puede afirmar que los avances en las tècnicas instrumentales de identificaciòn y cuantificaciòn de los C.P.A. , fundamentalmente en sensibilidad y selectidad , ha permitido simplificar los

protocolos analíticos .

Para una revisión ordenada de la extensa literatura existente sobre análisis de C.P.A. en distintas muestras consideraremos las etapas básicas de un supuesto protocolo genérico , que serían las siguientes :

- 1) Toma y preparación de las muestras.
- 2) Extracción , purificación y enriquecimiento.
- 3) Separación e identificación de componentes.

II.4.1. Toma y preparación de las muestras.

El tipo y número de manipulaciones necesarias para el muestreo de los sustratos varia con el estado físico de la muestra . Sin embargo , en muchas ocasiones a partir de un mismo sustrato muestreado con técnicas distintas se pueden obtener resultados diferentes , y ello puede deberse tanto a la técnica concreta de muestreo como a algunas características del propio sustrato . Así, por ejemplo , un contenido alto de materia orgánica en una muestra de agua puede imponer la necesidad de una filtración previa al uso de una resina adsorbente , con lo que obtendríamos dos soportes de propiedades fisico-químicas muy diferentes entre los que se repartirían la fracción de C.P.A , lo que dificulta la homogeneización y consiguientemente la reproductibilidad de los resultados (Shinohara et al ,1980). En otras ocasiones ,el uso de una determinada operación puede mejorar sensiblemente los resultados , y así , por ejemplo , se ha comprobado que la liofilización de las

muestras aumenta la reproductibilidad (Vassilaros et al , 1982). Por último , la constatación de que algunas características de las muestras condiciona los resultados obtenidos ha dado lugar a que sean necesarias especificaciones en los sustratos muestreados, y así , por ejemplo , hay que hacer constar el grado de madurez de un compost de basura (Elward , 1977) , las condiciones atmosféricas en que se toma una muestra de material particulado del aire (May y Wise , 1984) o la edad de un sedimento (Macleod et al , 1982).

Para muestrear material particulado del aire y aguas se necesitan técnicas específicas, mientras que en las restantes basta con homogeneizar , tamizar y liofilizar los sustratos (Griest y Caton , 1983). El material particulado del aire se suele tomar con filtros capaces de retener compuestos de muy diversa volatilidad , y su diseño adecuado condiciona la reproducibilidad de los resultados ya que los mayores errores se producen en la discriminación de componentes de volatilidad distinta en la toma de las muestras (Becher et al , 1981). Para la toma de muestras de aguas se emplean tanto la concentración de volumen por evaporación y posterior extracción líquido-líquido como las resinas adsorbentes (Grob et al , 1975 ; Van Rossun y Webb , 1978) , y su elección concreta viene determinada por el contenido de materia orgánica que ya hemos mencionado .

II.4.2. Extracción , purificación y concentración de los extractos de C.P.A.

La extracción , purificación y concentración eficiente de los C.P.A. de una muestra constituyen pasos cruciales para su determinación . A excepción de algunos casos aislados , como las cenizas volátiles de combustión de carbón en donde la eficacia no rebasa el 10% con cualquiera de los procedimientos ensayados , los resultados obtenidos siguiendo los protocolos con las tres fases mencionadas son satisfactorios (Griest y Caton , 1983).

Los C.P.A forman parte de sustratos que tienen un contenido global de materia orgánica muy diverso . Al realizar la extracción se obtiene la mezcla de sustancias carbonadas denominada fracción lipídica , cuya complejidad hace necesaria manipulaciones para fraccionar y purificar el primer extracto obtenido con el fin de conseguir una fracción final con el grado suficiente de pureza que permita la identificación y cuantificación de los componentes de la muestra . De ahí que los fundamentos de cualquier protocolo se basan en la observación de serie de medidas tendentes a la consecución de dicho objetivo , entre las que cabe señalar las siguientes :

- 1) La extracción debe realizarse procurando que la co-extracción de otros compuestos sea mínima.

- 2) Deben excluirse todas las manipulaciones que puedan degradar y/o discriminar componentes del primer extracto , por lo que se deben evitar tanto el uso de

disolventes poco volátiles y/o con capacidad de reacción con los C.P.A. como el número excesivo de operaciones básicas.

3) Conviene minimizar la introducción de contaminantes extremando la limpieza del material usado y la calidad y cantidad de los disolventes.

4) El tiempo de análisis debe ser corto y en condiciones que permita la protección de la luz para evitar los procesos de fotodescomposición de los C.P.A. (Griest y Caton , 1983).

Estos criterios han permitido la valoración comparativa de los distintos protocolos propuestos siguiendo el método habitual de determinar el tanto por ciento de sustancias patrones recobradas en un ensayo en blanco (Giger y Schaffner , 1978 ; Vassilaros et al , 1982 ; Coates et al , 1986) .

El conjunto de los numerosos protocolos existentes en la literatura puede clasificarse en tres grandes grupos :

- 1) Extracción con disolvente
- 2) Extracción con digestión alcalina.
- 3) Extracción por métodos térmicos.

La extracción con disolvente se puede realizar en Soxhlet , en baño de ultasonidos o con cualquier otro procedimiento de disrupción mecánica (MacLeod et al , 1982) , obteniéndose un primer extracto que contiene junto a los C.P.A. otras sustancias orgánicas . Los estudios comparativos realizados sobre las distintas técnicas de extracción con disolvente indican que el procedimiento más

adecuado es el baño de ultrasonidos ya que mejora ligeramente la eficacia extractante y acorta sensiblemente el tiempo de extracción (Jackson y Cupps , 1978). No obstante , la extracción en Soxhlet ha sido recomendado para los protocolos de materia particulada del aire (Sawicki et al , 1970). Los datos de la capacidad extractante de los distintos disolventes indican que los de mayor polaridad tienen una mayor eficacia global pero su uso conlleva mayores índices de co-extracción , y de ahí el uso generalizado de disolventes de polaridad mediana , de eficacia extractante aceptable y menores índices de co-extracción (Hilpert et al , 1978). El disolvente mas universalmente empleado , por su eficacia y el bajo punto de ebullición que permite la fácil evaporación del extracto, es el cloruro de metileno (Giger y Schaffner , 1978).

La extracción por digestión alcalina consiste en una hidrólisis alcalina seguida de una extracción líquido-líquido. Se aplica fundamentalmente a las muestras de origen biológico , y su carácter específico está motivado por la necesidad de poner ese tipo de muestra en condiciones adecuadas de ser extraída (Vassilaros et al , 1982). Su principal inconveniente es que el tratamiento alcalino puede modificar la naturaleza de los componentes de la muestra y por eso se recomienda las condiciones más suaves posibles en las concentraciones del álcali , temperatura y tiempo de la hidrólisis (Griest y Caton , 1983). El extracto obtenido está impurificado y es necesario someterlo a fraccionamiento y purificación.

La extracción por métodos térmicos se basa en la sublimación de los C.P.A. por calentamiento a vacío o por arrastre en corriente de nitrógeno ,recogiéndose el sublimado en un recipiente de vidrio o en un disolvente. Aunque no ha sido aplicado a todos los tipos de muestras , los datos para materia particulada del aire indican que su eficacia es equivalente a la extracción con disolvente en baño de ultrasonidos , pero el tiempo necesario es tres veces superior (Griest y Caton , 1983).

El número y tipo de manipulaciones empleadas en el fraccionamiento y purificación del extracto varía en los distintos protocolos propuestos , aunque de forma general se basan en la extracción líquido-líquido, cromatografía de adsorción y cromatografía de gel-filtración (Giger y Schaffner , 1978 ; Wise et al , 1980 ; Vassilaros et al , 1982) . Sin embargo , el progreso de las técnicas de identificación y cuantificación , sobre todo de las fases de la cromatografía gaseosa en columnas capilares y la cromatografía líquida de alta eficacia , ha permitido la simplificación de los procedimientos de purificación y concentración de los extractos , y en las publicaciones mas recientes se reducen a una cromatografía de adsorción específica , " clean up " , que acorta el tiempo de análisis y evita riesgos de pérdidas de los C.P.A. de la muestra (E.P.A. , 1984 ; Coates et al , 1986 ; Spitzer y Kuwatsuka , 1986) .

II.4.3. Separación e identificación de C.P.A en mezclas complejas.

En la separación e identificación de C.P.A. en extractos de diverso origen se han empleado fundamentalmente las cromatografías gaseosa (G.C.) , con distintos sistemas de detección y acoplada a la espectrometría de masas (GC- M.S.) , y líquida (H.P.L.C.) . Menos frecuentemente también se han utilizado métodos de detección que no requieren procedimientos de separación previa de componentes , entre los que podemos citar las espectroscopías de absorción ultravioleta (Morgante , 1974 ; Giger y Schaffner , 1978) , de efecto Shpolskii y de resonancia magnética nuclear (Lee y Novotny , 1976) . .

En las cromatografías citadas han sido decisivos los avances en la tecnología de columnas de separación , especialmente en el desarrollo de fases que mejoran la resolución de los compuestos .

Dado el carácter semipolar de los C.P.A. y el amplio margen de puntos de ebullición que presentan , la separación por cromatografía gaseosa implica que las columnas deben ser de elevada eficacia , polaridad mediana , escasa adsorción y buena termoestabilidad . Aunque se han utilizado gran variedad de columnas , la progresiva optimización de los parámetros que deciden su eficacia ha conducido a una recomendación casi unánime : deben ser capilares de sílice fundida, de un mínimo de 25 metros de longitud , de 0,25 mm de diámetro interno y un espesor de

película de fase SE-52 no inferior a 0,15 micras (Lee y Wright , 1980) .

Asimismo , se observa en la literatura actual sobre análisis de C.P.A. por G.C y G.C.- M.S. una gran coincidencia en las demás condiciones de trabajo , tales como flujos de gases , temperaturas del portal de inyección y del detector y programación de la temperatura de calentamiento del horno , que con ligeras variantes son las que se describen mas adelante al especificar la metodología empleada en este estudio .

La gran variedad de detectores usados en G.C. nos da un índice de su versatilidad y aceptación. El mas difundido es el detector FID , con el que se consigue identificar la mayoría de los C.P.A. y para el que existe en la literatura una amplia lista de trabajos sobre sus índices de retención (Lee et al , 1979 ; Whalen-Pedersen y Jurs , 1981 ; Nishioka et al , 1986) . También se han empleado detectores específicos para algunos tipos de compuestos como los de espectros de infrarojo con transformada de Fourier para isómeros alquílicos (Hembree et al , 1981) o los de ionización termiónica para los derivados nitro de los C.P.A. que tienen especial actividad cancerígena (Tomkins et al , 1984) .

En cuanto a H.P.L.C. , los primeros trabajos sobre separación de C.P.A. usaron columnas rellenas de la llamada fase normal ya que tradicionalmente se habían empleado columnas de adsorción de sílice y alúmina en la purificación de los extractos de dichos compuestos . En

este tipo de columnas se observaba que los compuestos pericondensados se adsorbían con mayor intensidad que los demás, provocando la elución simultánea de compuestos que se resolvían bien por cromatografía gaseosa, como, por ejemplo, fenantreno y pireno. Aunque se consiguió mejorar la resolución disminuyendo el tamaño de partículas de la fase seguían presentándose problemas de reproductibilidad de los tiempos de retención como consecuencia de las variaciones en el contenido en agua de los eluyentes, y prácticamente el uso de estas columnas quedó postergado, limitándose su empleo a una técnica alternativa de purificación de extractos. La aparición de las columnas de fase ligada, fundamentalmente las de soportes silíceos y grupos funcionales polares como aminos y nitrilos, significó una mejora sensible en el tiempo de análisis y en el poder de resolución, pero seguían existiendo las dificultades de reproductibilidad en los tiempos de retención (Chimielowiec y George, 1980). Sin embargo, el desarrollo de la cromatografía en fase reversa, es decir de fases apolares y eluyentes polares, significó un avance notable del poder de resolución y tiempo de análisis y a la vez ha eliminado la dificultad de reproductibilidad de los tiempos de retención. En este sentido, cabe resaltar que el radical octadecilo ligado a un soporte es especialmente adecuado para estos compuestos (May y Wise, 1984) y que la composición y régimen de los eluyentes puede mejorar la eficacia y selectividad de una columna determinada (Katz y Ogan, 1980).

En H.P.L.C. los detectores mas ampliamente usados son los de fluorescencia (Nielsen , 1979) y ultravioleta (Sorrell y Reding , 1979) . Sin embargo , el gran avance en sensibilidad y selectividad de la detección se ha producido con el desarrollo de los detectores de ultravioleta de longitud de onda variable asistido por ordenador , que permiten la monitorización de los espectros de barrido continuo de cada uno de los compuestos (Ruckmick y Hurtubise , 1985).

En cuanto a GC-MS cabe decir que fundamentalmente aporta un aumento notable de la sensibilidad en la detección (Giger y Schaffner , 1978 ; Snook et al , 1979 ; Hirata et al , 1981; Grimmer et al , 1983) , pero que existen dificultades en la determinación de la estructura de isómeros a partir de los espectros de masas , por lo que son necesarios métodos complementarios como , por ejemplo , el procedimiento de la monitorización selectiva de iones (S.I.M.) para algunos tipos de compuestos , y con caracter mas general la co-cromatografía que aporta el dato complementario de los tiempos de retención (Vassilaros et al , 1982).

Por último , los intentos de acoplar la espectrometría de masas a la cromatografía líquida presenta dificultades en la eliminación de los eluyentes , y aunque constituye una técnica esperanzadora , no se han resueltos gran parte de los problemas derivados de la necesidad de eliminar los disolventes (Chistensen et al , 1981).

III. MATERIAL Y METODOS



III.1. Descripción de las muestras y
criterios adoptados para la
selección de las mismas.

Todas las muestras de suelo y otros substratos susceptibles de enriquecerse en CPA por la combustión o pirólisis de biomasa, analizadas en el presente trabajo se tomaron en la campiña de Almonte (Huelva), en la proximidad de la zona de marismas del Coto Doñana.

En el cuadro siguiente se detalla la naturaleza y el origen de las diferentes muestras y las siglas que se han adoptado para su denominación:

-
- Suelo testigo en incendio de pinar STIP
 - Suelo de pinar incendiado SIP
 - Suelo del mismo pinar dos años después del incendio SIP-2
 - Suelo testigo de quema de rastrojera STIR
 - Suelo de incendio controlado de rastrojera SIR
 - Suelo soporte de cascada de leña de olivo CIS
 - Suelo soporte de hoguera de pino SHP
 - Suelo de hoguera de pino realizada hace 100 años SHP-100
 - Tierra de cubierta de boliche de leña de pino SCBP
 - Carbon de pino CP
 - Tierra de cubierta de boliche de leña de Eucalipto SCBE
 - Carbon de Eucalipto CE
 - Tierra de cubierta de boliche de leña de alcornoque SCBA
 - Carbón de alcornoque CA
-

De acuerdo con el planteamiento de objetivos, la selección de muestras se orientó inicialmente al estudio del impacto sobre el suelo de los CPA emitidos en incendios incontrolados de masas forestales y en la quema controlada de zonas desarboladas, principalmente rastrojeras de cereal, que en Andalucía constituye una práctica ancestral ampliamente difundida. Se trataba así de abordar el estudio de los casos potencialmente más relevantes de incidencia de CPA, dada la frecuencia e importancia cuantitativa, en número de hectáreas afectadas, de ambos fenómenos, al tiempo que se contaba en principio con dos tipos de muestras de características muy diferentes, por variar entre sí tanto la naturaleza de la biomasa como las condiciones de combustión de la misma.

Como muestra representativa de los efectos del incendio incontrolado se eligió el suelo de un pinar (SIP), por constituir la variedad forestal más abundante en nuestra región, empleada prioritariamente en las campañas de repoblación forestal de los últimos 50 años, y poseer un alto grado de inflamabilidad, lo que la convierte en la especie más frecuentemente afectada por incendios accidentales o provocados. En el pinar incendiado donde se tomó la muestra existía un matorral de gramíneas, jara y lentisco que desapareció bajo los efectos del fuego al igual que las copas de los pinos, de los que sólo quedaron troncos parcialmente calcinados. Los efectos del incendio en cuanto a la incidencia de CPA se evaluaron por comparación de datos con suelo del mismo pinar no afectado por el fuego (STIP).

Asimismo, se estudió la persistencia de los efectos analizando el perfil de CPA de dicho suelo dos años después de haberse producido el incendio (SIP-2), tiempo suficiente para el desarrollo de una nueva capa de matorral de gramíneas y, en menor grado, jara y lentisco. La mayoría de los troncos calcinados habían sido cortados y sólo algunos habían brotado de nuevo.

La muestra de suelo soporte de incendio provocado de rastrojera de cereal (SIR) se tomó en la superficie del mismo, parcialmente ennegrecida como consecuencia de la combustión de los restos de las cañas o paja de la mies que quedaron en el suelo después de la siega. Los efectos de esta quema controlada se analizaron por comparación con la rastrojera sin quemar (STIR), que también utilizamos como testigo para evaluar la incidencia del proceso de producción de cisco (carbón menudo) mediante la quema de ramas de olivos provenientes de la poda anual del olivar (CIS). La ciscada, en la que una vez quemadas las hojas y ramas más pequeñas se apaga la combustión con agua, quedando un material leñoso semicalcinado que constituye el cisco, constituye también un caso de quema abierta y controlada de biomasa, pero deben diferenciarse sus efectos respecto de los de la rastrojera, ya que difieren el material vegetal y el volumen del mismo sujeto a combustión.

Por último, dentro del estudio de los efectos producidos por la combustión abierta de biomasa se eligió una muestra puntual de suelo soporte de hoguera de pinos realizada hace aproximadamente 100 años (SHP-100), cuando se

produjo en esta campiña una extensa reconversión de pinares en tierras cultivables. La muestra se tomó en una de las frecuentes manchas de suelo ennegrecido que se observan por toda la zona, y que corresponden a los puntos en donde se apilaron los pinos arrancados para su quema. Para comprobar la persistencia en el tiempo de los efectos producidos, la muestra anterior se comparó con la de un suelo soporte de hoguera de pino reciente (SHP). Para ello se quemaron 2 Tm de madera de pino en un punto próximo al de la toma de muestra anterior, muestreándose el suelo soporte inmediatamente después de la extinción de la hoguera por agotamiento de la madera.

Las muestras restantes se eligieron bajo el criterio de que en ellas fuera posible estudiar las vías naturales de formación y distribución de CPA a partir de precursores biogénicos como consecuencia de la combustión de biomasa.

Ya que en los casos de combustión abierta, todas las muestras citadas hasta ahora, es inevitable la pérdida de componentes volátiles, que se dispersan en las fases de humos (Atlas et al., 1985), y muchos de esos compuestos pueden ser claves para el establecimiento de los mecanismos genéticos, era necesaria la elección de muestras en las que quedara minimizada esta circunstancia.

Con tal fin se aprovecharon para toma de muestras una práctica artesanal de producción de carbón vegetal, frecuente en Andalucía y otros puntos de la geografía española, en hornos pequeños de reverbero, que reciben por esta zona el nombre de "boliches". Básicamente el proceso

consiste en apilar unas 10 Tm de madera, que se recubren de tierra dejando en la parte superior varias salidas de gases, y a ras del suelo entradas de aire, adoptando el conjunto forma semiesférica. De esta forma, la mayor parte de la leña se quema lentamente con la menor cantidad posible de aire a lo largo de unos veinte días en condiciones que podemos calificar de semi-pirólisis. Terminado el proceso, se extingue la combustión cerrando las entradas de aire. En estos hornos, los substratos susceptibles de acumular los CPA son el suelo soporte, la tierra de cubierta y el carbón vegetal producido en la pirólisis incompleta de la leña. Las muestras se tomaron en sendos boliches de madera de pino (SCBP, CP), Eucalipto (SCBE, CE) y Alcornoque (SCBA, CA).

El conjunto de muestras elegidas cubre un amplio rango de efectos sobre el medio atribuibles a variaciones en las condiciones de combustión de diferentes cantidades y tipos de especies vegetales, que pueden resumirse en los siguientes casos:

1) Incendio abierto, controlado o no, de masas forestales (variación de los efectos con el tiempo) y rastrojeras.

2) Combustión abierta y puntual de leña de pino (variación de los efectos con el tiempo) y ramas de olivo.

3) Pirólisis parcial en horno de maderas de pino, eucalipto y alcornoque.

III.2. Preparación de las muestras para el análisis y determinación de la materia orgánica de las mismas.

Para evitar las elevadas desviaciones standar típicas del análisis de CPA en muestras ambientales (Cuberes et al., 1984), el muestreo se realizó, en los primeros 10 cm. de los suelos afectados, tomando en todos los casos 200 g de diferentes zonas del total de superficie afectada hasta obtener aproximadamente 1 Kg. Igual procedimiento se siguió para el muestreo de las tierras de cubierta y los carbones en los boliches. Tras realizar una mezcla cuidadosa, el total de muestra se molió y tamizó por un tamiz de 2 mm de luz de malla. El secado de las muestras se llevó a cabo por liofilización durante un periodo de 10-14 horas a una presión de aprox. 0,05 Torr. De esta forma se evitan las pérdidas de componentes volátiles y se facilita el almacenaje y manejo posterior de las muestras.

El Carbono orgánico total se determinó cuantitativamente en muestras descarbonatadas con un analizador de C "Carmograph-12". La muestra se quema a 1000 C en ausencia de aire y el CO₂ desprendido se cuantifica directamente, corrigiéndose el valor para mg de C. Con muestras procedentes de la combustión de material vegetal este procedimiento es preferible al cálculo de C orgánico oxidable por vía húmeda mediante oxidaciones con permanganato o dicromato, de acuerdo con Almendros et

al., 1986.

III.3. Métodos de extracción y concentración de CPA

Con el fin de elegir el procedimiento de extracción y concentración más idóneo para el análisis de CPA en nuestras muestras, se ensayaron, dentro de la gran variedad de protocolos existentes para el estudio de muestras ambientales (ver apartado II.4), aquellos de eficacia probada más representativos de diferentes tendencias metodológicas.

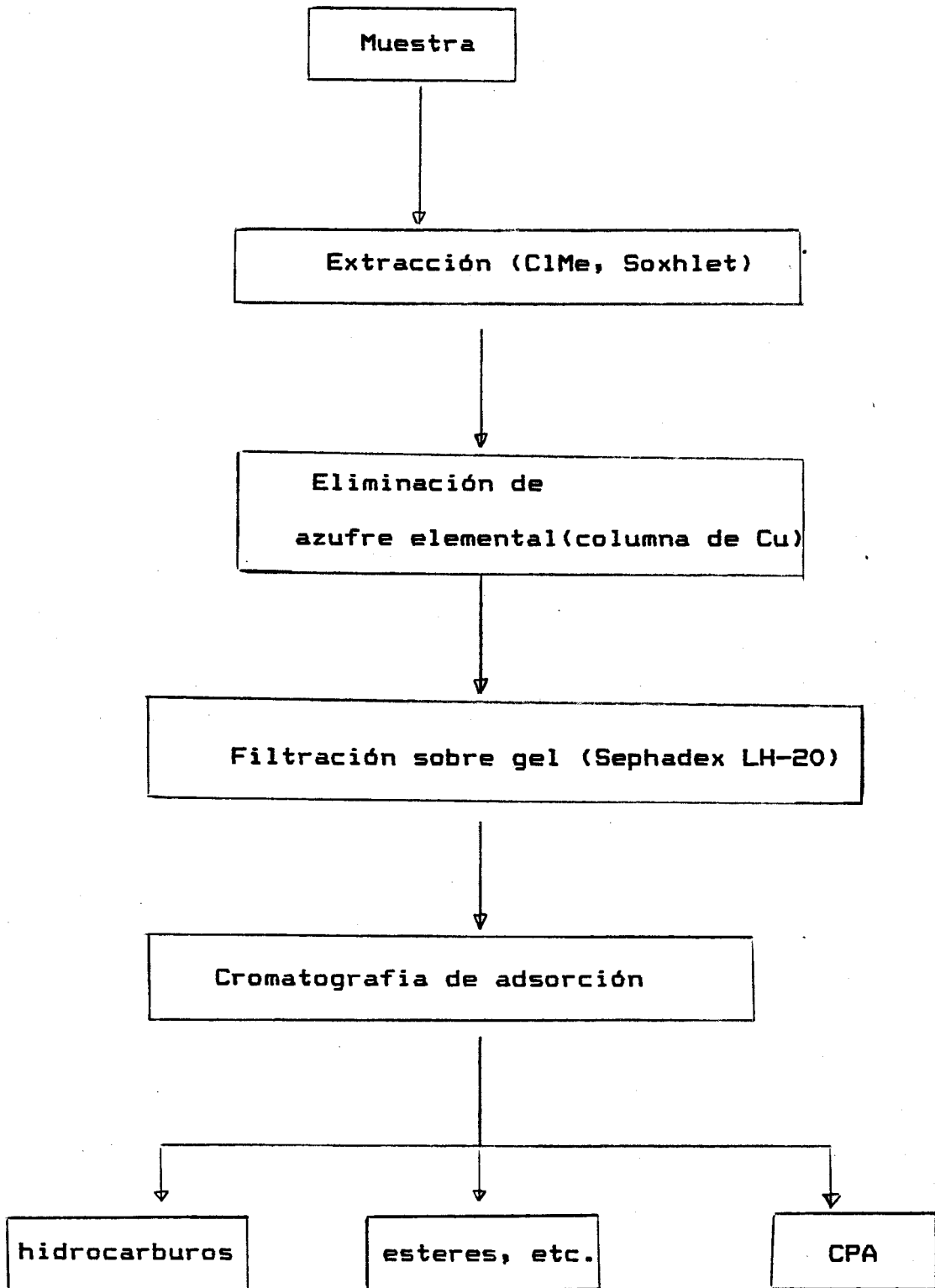
A continuación se describen en detalle cada uno de ellos:

A) Método de Giger y Schaffner, 1978

Su fundamento básico es la extracción directa con disolventes y ha sido aplicado al estudio de CPA en sedimentos y materia orgánica particulada de aguas continentales y marinas, aerosoles, polvos de calle y suelos.

Las distintas etapas del método son, en síntesis, las siguientes: La muestra se seca a 40°C durante 18 h y se extrae con 70 ml de Cloruro de metileno (ClMe) en un equipo Soxhlet durante 6 horas. Se comprobó que un tiempo adicional de 24 horas tan sólo aumenta el rendimiento del extracto en menos de un 3% . El extracto se concentró a 3 ml a baja temperatura en un rotavapor y se pasó por una columna

Esquema MM-1



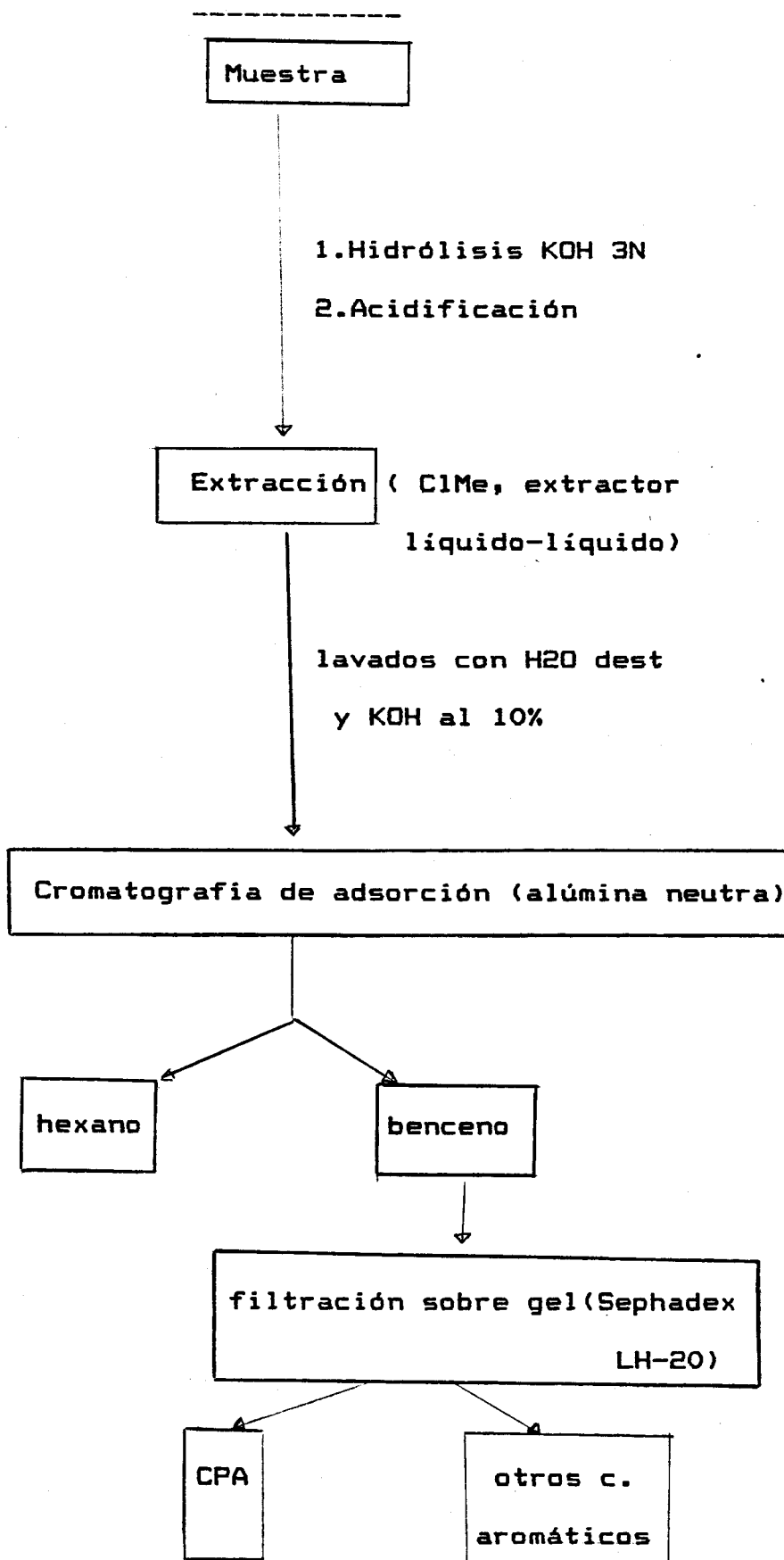
rellena de Cu activado (12 g) para eliminar azufre elemental. El eluato se llevó a sequedad, se recogió en 2 ml de benceno/metanol (1:1) y se sometió a filtración sobre gel. Con este fin se empaquetaron 20 g de Sephadex LH-20 estabilizado en benceno/metanol en una columna de vidrio (50x 1,6 cm), y eluyendo con la misma mezcla de disolventes se obtuvieron dos fracciones de 50 ml cada una. Ambas fracciones se evaporan a sequedad en condiciones suaves (rotavapor, 30°C), se redisuelven en 1 ml de pentano y se aplican por separado a columnas de silica gel (1 cm d.i., 10 ml volumen de lecho), eluyéndose secuencialmente con n-pentano (25 ml) y ClMe (25 ml). La fracción de cloruro metileno obtenida a partir del segundo eluato del Sephadex concentra los CPA. El esquema MM-1 recoge sintéticamente las distintas fases de este método.

B) Método de Vassilaros et al., 1982, modificado

Es representativo de aquellos procedimientos basados en el ataque alcalino previo del sustrato a analizar, y ha sido aplicado fundamentalmente al estudio de muestras biológicas.

La muestra se hidroliza con KOH 3N y se homogeniza hasta que toda la materia sólida queda disuelta o finamente dispersa. La mezcla obtenida se transfiere a un matraz y se pone a reflujo moderado durante 4 horas. El digerido se lava con agua destilada (100 ml) en un embudo de decantación, se acidifica a pH 4 con ácido acético y se extrae con ClMe (250mlx3). Los extractos combinados se concentran hasta 250 ml en un rotavapor, y se lavan con agua destilada y con una

Esquema MM-2



solución acuosa de KOH al 10%. El extracto se concentra a sequedad, se redissuelve en hexano y se cromatografía sobre una columna de alúmina básica (9g, 30x11mm), eluyendo secuencialmente con 30 ml de hexano (hidrocarburos alifáticos) y 100 ml de benceno (fracción enriquecida en CPA). En el protocolo original se obtiene eluyendo con cloroformo una tercera fracción en la que se concentran los CPA nitrogenados. Este paso se omitió en nuestro caso, ya que este tipo de componentes no se emiten normalmente en la quema de material vegetal, y requieren además un tipo particular de detector cromatográfico del que no se disponía.

La fracción de CPA se concentra en un rotavapor y se cromatografía por Sephadex LH-20 (BioBeads SX-12, con un límite de exclusión de 400 en el procedimiento original), empleando ClMe como eluyente. A partir de 20 ml se comprobó por espectroscopia de UV que empieza a eluirse la fracción purificada de CPA. En el diagrama de flujo siguiente (MM-2) se representa esquemáticamente el protocolo descrito.

C) Método EPA modificado

Denominamos así a este tercer protocolo por estar basado en una recomendación genérica de la EPA, consistente en la reducción al máximo de las etapas necesarias para la obtención de una fracción enriquecida en CPA. Muy recientemente han sido aplicados métodos similares al que describiremos a continuación, al estudio de CPA en materiales biológicos (Coates et al., 1986) y suelos (Spitzer

y Kuwatsuka, 1986). Sin embargo, el método que se ha desarrollado contiene una serie de innovaciones metodológicas, que permiten su diferenciación de otros semejantes.

Las sucesivas fases del protocolo fueron las siguientes: la muestra (20-30 g) se extrae con ClMe en baño de ultrasonidos durante 20 minutos, repitiéndose la operación tres veces con renovación del disolvente. Los extractos unificados se filtran y evaporan a sequedad a temperatura ambiente y presión reducida. El extracto total se recoge en isooctano y se inyecta en un cartucho de alúmina ácida (Sep-Pak, Waters), eluyéndose secuencialmente con n-hexano (10 ml) y ClMe (10 ml) para obtener fracciones enriquecidas en hidrocarburos alifáticos y aromáticos respectivamente.

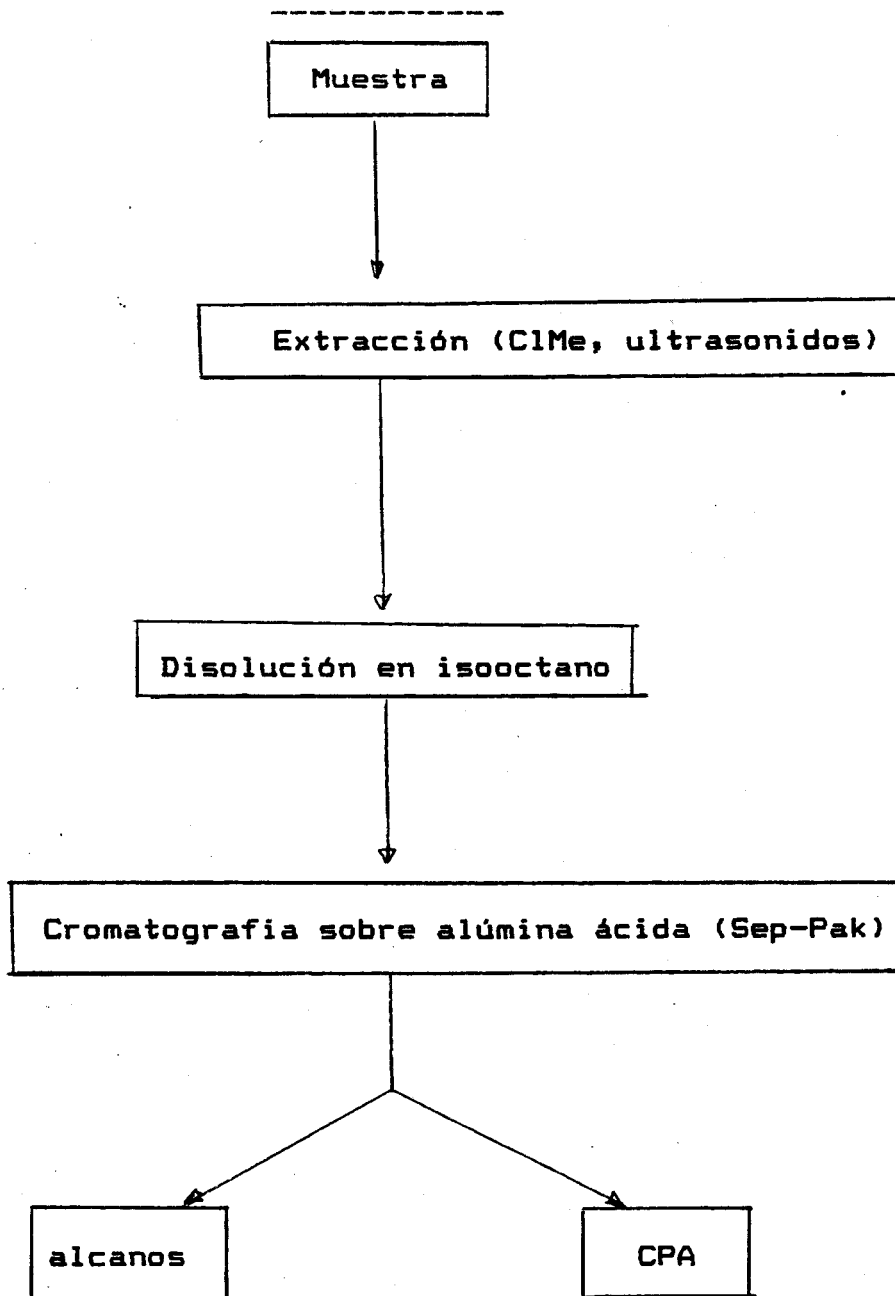
El protocolo se resume en el esquema MM-3.

En todas las experiencias se usaron reactivos de gran pureza (Merck). Los disolventes orgánicos se destilaron por dos veces en equipo de vidrio antes de su empleo.

III.4. Evaluación con sustancias modelo de la eficacia de los diferentes métodos

Con el fin de elegir la metodología más adecuada para el análisis de los CPA en las muestras seleccionadas, se realizaron una serie de ensayos preliminares enfocados a evaluar la eficacia de los procedimientos más comúnmente

Esquema MM-3



empleados, tanto por separado en las etapas críticas de fraccionamiento y purificación del extracto inicial y separación e identificación de las mezclas de CPA, como en el conjunto de los protocolos anteriormente descritos. Para ello se emplearon patrones de CPA de calidad cromatográfica suministrados por Fluka, A.G.

III.4.1. Evaluación de métodos de fraccionamiento y purificación

Los tres métodos ensayados fueron la filtración sobre gel de Sephadex LH-20, la cromatografía de adsorción sobre gel de sílice y la cromatografía de adsorción sobre cartuchos (Sep-Pak) de alúmina neutra.

La solución madre de patrones (A) se preparó a partir disoluciones en ClMe de los siguientes compuestos : fluoreno (4,5 mg/ml), pireno (4,3 mg/ml) y benzo(a)fluoreno (3,8 mg/ml).

Como técnica de detección se empleó en todos los casos la espectroscopía de UV, debido a la excelente diferenciación entre CPA que presentan los espectros de UV y la ventaja que supone el hecho de poder realizar las medidas directamente en los diferentes eluatos sin otro tipo de manipulaciones. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro Pye Unicam, modelo SP 1800, registrándose barridos entre 210 y 340 nm en un registrador AR-25 de la misma marca acoplado al espectrofotómetro.

En el caso de la filtración sobre Sephadex LH-20 se

determinaron bajo diferentes condiciones experimentales (diferentes dimensiones de la columna, volúmenes de lecho, velocidad de flujo del eluyente y tipos de eluyentes) los "puntos de corte" (cut points) a los que se eluían los diferentes CPA.

Asimismo, en las experiencias sobre cromatografías de adsorción se modificaron diferentes condiciones y se observaron los repartos de la mezcla de CPA entre eluyentes distintos aplicados secuencialmente.

III.4.2. Evaluación de las técnicas de separación e identificación

Se estudió comparativamente la eficacia de las técnicas de cromatografía de gases (GC) y cromatografía de líquidos (HPLC) utilizando la siguiente mezcla de patrones (B): naftaleno (4,8 mg/ml), acenafteno (4,7 mg/ml), fluoreno (4,3 mg/ml), antraceno (3,9 mg/ml), fluoranteno (3,7 mg/ml) y pireno (3,2 mg/ml). Las condiciones experimentales empleadas en cada caso se describen a continuación:

1) Cromatografía de gases :

En primer lugar se hizo un estudio comparativo para seleccionar la fase estacionaria más adecuada, inyectando la mezcla de patrones en columnas capilares de SE-52, OV-1 y OV-101 en las mismas condiciones. Dentro de estrechos márgenes en diferencias de resolución y forma de los picos, resultó preferible la fase de SE-52, y el estudio se realizó empleando una columna de sílice fundida (25 m x 0,32

mm) impregnada con dicha fase (espesor de 0,25 μm), montada en un cromatógrafo de gases marca Hewlett-Packard modelo 5730 A, equipado con detector de ionización de llama (FID). La inyección de las muestras se hizo sin división de flujo (splitless) a temperatura ambiente para facilitar la mejor resolución de los picos en base al llamado "efecto disolvente". La temperatura (T) del portal de inyección se mantuvo a 270°C. A los 30 segundos de la introducción de muestra se abre la válvula de división de flujo (split), purgándose el septum y el portal de inyección a velocidades de flujo de 2 y 50 ml/min. Tras la elución del disolvente, la T del horno se sube hasta la T inicial de 100°C a la máxima velocidad y seguidamente a 6 °C/min hasta 280 °C, donde se mantiene isoterma un mínimo de 15 min. El detector se puso a una T de 300 °C, y como gas portador se empleó N₂ a una velocidad de flujo de 1 ml/min.

El grado de reproducibilidad de la técnica se determinó por comparación entre cromatogramas de una muestra compleja de CPA inyectada repetidas veces.

2) HPLC:

La misma mezcla de patrones (B) se inyectó en un cromatógrafo de la firma Water, equipado con dos bombas, modelo 510, inyector universal U6K, detector de UV-V, modelo 481, controlador de gradiente y módulo de tratamiento de datos. Las medidas se realizaron a 252 nm. Se utilizó una columna (15 cm. x 3,9 mm d.i.) empaquetada con Novapak C18 con tamaño medio de partícula de 4 μm . Se utilizaron como disolventes acetonitrilo y agua, con el siguiente programa

de elución: en los primeros 15 minutos, mezcla al 50% de los dos; del minuto 15 al 23 aumento lineal de la concentración de acetonitrilo hasta el 100%, manteniéndose finalmente en régimen isocrático durante 27 minutos. La velocidad de flujo se mantuvo a 0,5 ml/min.

III.4.3. Evaluación de los protocolos descritos

Se empleó para ello el método habitual de determinar los porcentajes de recuperación de sustancias standards añadidas a un soporte inerte tras la aplicación de los procedimientos. La mezcla de patrones (C) utilizada fué la siguiente: naftaleno (4,8 mg/ml), 2 metil-naftaleno (8,6 mg/ml), acenafteno (8,3 mg/ml), fluoreno (5,6 mg/ml), antraceno (5,9 mg/ml), 2 metil antraceno (5,8 mg/ml) y pireno (6,0 mg/ml). Alicuotas de esta solución se tomaron para "repicar" muestras de arena lavada extraída con ClMe, que se sometieron a los tres protocolos que hemos descrito anteriormente.

Las mezclas enriquecidas en CPA obtenidas en cada caso, se analizaron y cuantificaron mediante cromatografía de gases, empleando las mismas condiciones utilizadas para evaluar las técnicas de separación. Los porcentajes de recuperación de cada sustancia patrón se determinaron por cuantificación de áreas de picos sobre los cromatogramas, obteniéndose valores medios de tres repeticiones.

III.5. Separación, identificación y cuantificación de CPA en las muestras

El análisis de CPA en las muestras problema se llevó a cabo con el protocolo EPA-modificado. Para la separación por GC, las fracciones enriquecidas en CPA se evaporaron a sequedad a baja temperatura mediante una corriente de N₂. Alicuotas de 1-2 µl recogidas en un disolvente apolar no aromático (generalmente CHCl₃) se inyectaron indistintamente en cromatografos de gases HP 5730-A y Konik 300C en las mismas condiciones descritas para el análisis de patrones.

La identificación de los componentes individuales se llevó a cabo en un sistema cromatografía de gases-espectrometría de masas-computador, marca Hewlett-Packard, modelo 5995 B, empleando la misma columna e idénticas condiciones cromatográficas, una vez comprobada la completa reproducibilidad entre los respectivos cromatogramas de FID y de ión total. Los diferentes procedimientos utilizados para establecer la identidad de los compuestos fueron los siguientes : a) comparación de los espectros de masas con los almacenados en tablas (Eight Peak Index of Mass Spectra y EPA/NIH Mass Spectral Data Base) y en las librerías del computador (NBS-Spectra), así como con los anteriormente citados en la bibliografía especializada, b) estudio de los posibles mecanismos de fragmentación, c) monitorización de un ión en tiempo real (SIM), en el caso de asignación tentativa de compuestos presentes a nivel traza,

y d) co-cromatografía con patrones.

Este último procedimiento de identificación fue especialmente útil para la identificación de isómeros, que presentan espectros de masas casi idénticos. Para ello se eligieron unos CPA modelos en función de las características de las muestras estudiadas y se inyectaron en las condiciones cromatográficas señaladas por Lee et al., 1979, y en las seleccionadas para nuestro trabajo, comprobándose la aceptable reproducibilidad de los "índices de retención" (RI) obtenidos con los publicados por diversos autores. Este parámetro se calcula según la siguiente expresión:

$$RI = 100 (TR_s - TR_z / TR_{z+1} - TR_z) + 100 z$$

donde TR_z y TR_{z+1} corresponden a tiempos de retención de compuestos modelos con número creciente de anillos (naftaleno, fenantreno, criseno y piceno), TR_s es el tiempo de retención de cada sustancia y z el número de anillos de la sustancia con TR_z .

La cuantificación de componentes se realizó mediante la técnica del patrón interno. Para la elección del mismo se tuvieron en cuenta, en la medida de lo posible, las condiciones ideales que debe reunir, a saber : a) debe tener un TR distinto al de los compuestos de la mezcla, b) su TR debe ser próximo al de los compuestos que se quieren cuantificar, c) debe ser químicamente semejante y tener una respuesta al detector similar a la de los componentes de la muestra, y d) puede emplearse en concentraciones del mismo orden que las de los compuestos de la muestra (Poole y Schuette, 1983).

Existen diversos precedentes de la cuantificación de CPA en muestras ambientales, en los que se han empleado como patrón interno compuestos tales como 1,cloro-tetradecano (Giger y Shaffner, 1978), hexametilbenceno (Wise et al.,1980), n-pentacosano y n-hexacosano (Otha et al.,1983), etc. En nuestro caso, se eligieron, de acuerdo con los criterios expuestos, tantos patrones internos como zonas diferenciadas en TR observamos en el cromatograma de sustancias modelos. Así, se eligió 2,metil-naftaleno para la zona de TR de 2 a 7 minutos, antraceno para la zona de 7 a 14 minutos y pireno para la zona de 14 a 25 minutos. Este último presentaba el inconveniente de estar presente en algunas muestras problema, pero en concentraciones lo suficientemente bajas como para no inducir errores significativos en la cuantificación de compuestos próximos de interés, por otra parte muy escasos en esta zona del cromatograma.

Una vez elegidos los patrones internos se calculó el factor de respuesta de los mismos teniendo en cuenta la relación :

$$F = W_i A_s / W_s A_i$$

donde W_i = peso del patrón interno, W_s = peso de la sustancia que se quiere cuantificar, A_i = área cromatográfica del pico del patrón, y A_s = área cromatográfica de la sustancia problema (HP Lab.Report 1005).

Para ello se prepararon las siguientes disoluciones con concentraciones conocidas variables de cada patrón y un CPA

de TR próximo :

- Disolución 1 : Naftaleno y 2,metil-naftaleno

| c. Naftaleno (ng/μl) | c. 2,metil-naftaleno (ng/μl) | relación N/2MN |
|-------------------------|---------------------------------|----------------|
| 20 | 20 | 1 |
| 30 | 20 | 1,5 |
| 40 | 20 | 2 |

- Disolución 2 : Fluoreno y Antraceno

| c. Fluoreno (ng/μl) | c. Antraceno (ng/μl) | relación F/A |
|------------------------|-------------------------|--------------|
| 20 | 20 | 1 |
| 30 | 20 | 1,5 |
| 40 | 20 | 2 |

- Disolución 3 : 1,metil-antraceno y pireno

| c. 1,metil-antr. (ng/μl) | c. pireno (ng/μl) | relación 1MA/P |
|-----------------------------|----------------------|----------------|
| 20 | 20 | 1 |
| 30 | 20 | 1,5 |
| 40 | 20 | 2 |

Se cromatografiaron las diferentes disoluciones y, atendiendo a las áreas de los picos y a las diferentes proporciones de compuestos se obtuvieron las curvas de calibrado que se presentan en la figura 1, en las que puede observarse que son diferentes los factores de respuesta de los patrones elegidos para cada zona del cromatograma.

Finalmente se comprobó la validez de las curvas de calibrado comparando concentraciones conocidas de CPA con las obtenidas midiendo áreas cromatográficas.

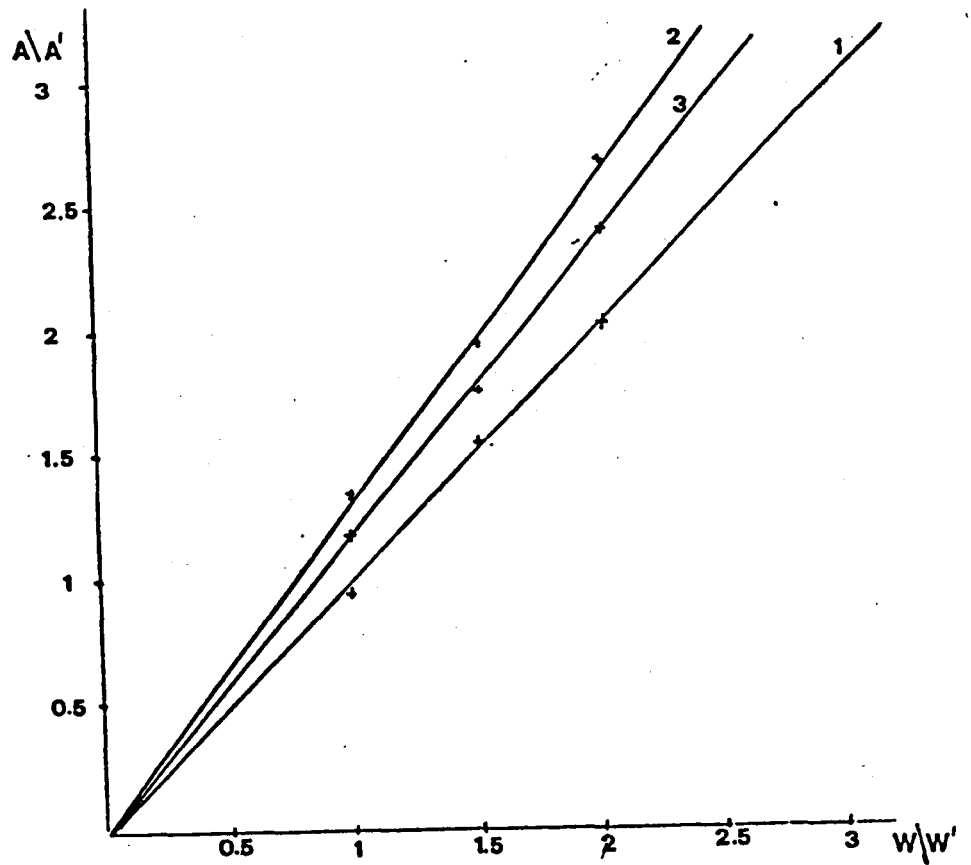


Figura 1

Factor de respuesta de patrones

1. de 2-metilnaftaleno

2. de antraceno

3. de pireno

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV.1. EVALUACION DE METODOS.

Se ha mencionado en la introducción que la eficacia del procedimiento analítico es un condicionante para los estudios de la incidencia de C.P.A. en el medio ambiente . Por esta razón el trabajo experimental se inició con la evaluación de diferentes procedimientos analíticos con el fin de elegir las condiciones mas idóneas para el estudio de las muestras.

Aunque a priori , por limitaciones obvias de tipo instrumental , hubo que descartar algunas técnicas como , por ejemplo , los métodos de extracción térmica o la detección por espectroscopia NMR , IR , o de efecto Shpol'ski , la evaluación se ha realizado comparando procedimientos avanzados de probada eficacia en la determinación de C.P.A. en diferentes sustratos .

Previamente se discutieron , mediante experiencias con sustancias modelos , la eficacia de las dos etapas críticas en todo procedimiento de determinación de C.P.A.: el fraccionamiento y purificación del extracto y las técnicas de separación e identificación de componentes individuales.

IV.1.1. Procedimientos de fraccionamiento y purificación de los extractos .

Se ensayaron los dos métodos mas usuales de fraccionamiento del extracto global y de obtención de la fracción enriquecida en C.P.A. , que se basan respectivamente en la cromatografía de filtración sobre gel (Sephadex LH-20) y en la cromatografía de adsorción sobre sílice y/o alúmina.

Para ello se utilizaron la mezcla de patrones A (fluoreno , pireno y benzo(a)fluoreno) y como técnica de detección la espectroscopia de UV , recomendada por algunos autores (Giger y Schaffner , 1978 ; Scott y Prohaska , 1981) , que da buenos resultados en mezclas poco complejas , por la especificidad de las bandas de UV para estos compuestos , y que ofrece la ventaja de eliminar manipulaciones de las fracciones eluidas como la evaporación del disolvente o la destrucción de parte del mismo si se emplea la identificación por GC.

Las columnas de Sephadex LH- 20 se basan en la utilización simultánea de la filtración y adsorción sobre gel que permite tanto la purificación del extracto de lípidos y pigmentos como la elución de fracciones con C.P.A. de distinto tamaño . Sin embargo , la principal dificultad estriba en la estricta determinación de los límites de separación entre las fracciones (cut points). En nuestro caso , se probaron diferentes condiciones de

fraccionamiento (tamaño de columnas , volumen de lecho , flujo de eluyentes , etc) mostrándose en la figura 2 un ejemplo representativo de los resultados obtenidos con las condiciones determinadas en el protocolo de Giger y Schaffner descrito en material y métodos (Pag.36). En la fracción 0 a 20 ml se detecta predominantemente fluoreno (bandas entre 240 y 260 , 286 y 296) , mientras que en las restantes se detectan pireno (bandas 276 , 304 , 318 y 332) y benzo(a)fluoreno (bandas 260 y 272) pero sigue existiendo indicios de fluoreno . Parece confirmarse , por tanto , que no se producen cortes definidos entre C.P.A. de distinto tamaño , por lo que la aparente ventaja del fraccionamiento por número de anillos conlleva el riesgo de la no detección de alguno de ellos en el posterior análisis por GC-MS.

En cambio mediante cromatografía de adsorción sobre sílice o con Sep-Pak de alúmina ácida se obtienen un extracto enriquecido en C.P.A. en la fracción de cloruro de metileno , susceptible de separarse por GC sin pérdidas de componentes, tal como se muestra en la figura 3 . Además, la cantidad menor de eluyentes usados con el Sep-Pak suponía un menor riesgo de pérdidas de componentes durante la eliminación del mismo y , a la vez , una disminución de la posibilidad de introducir los contaminantes de los disolventes (estabilizantes e impurezas), por lo que se eligió el Sep-Pak como mas idóneo y así se ha descrito en el procedimiento EPA modificado.

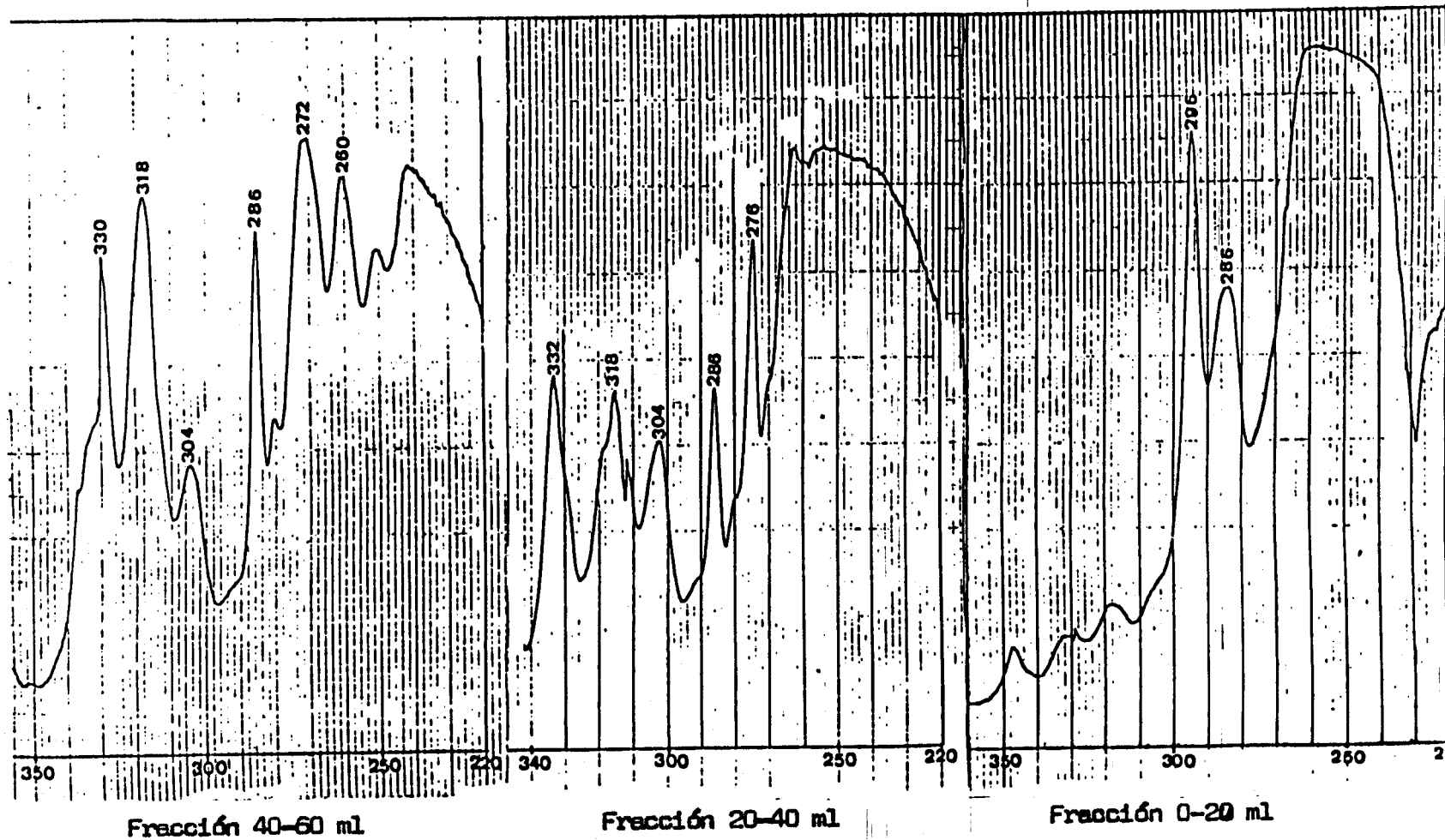
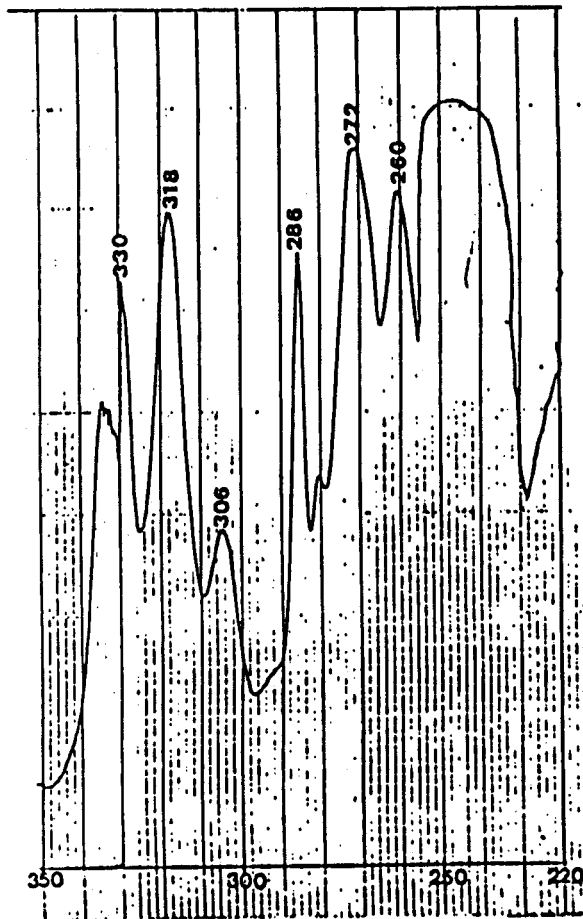
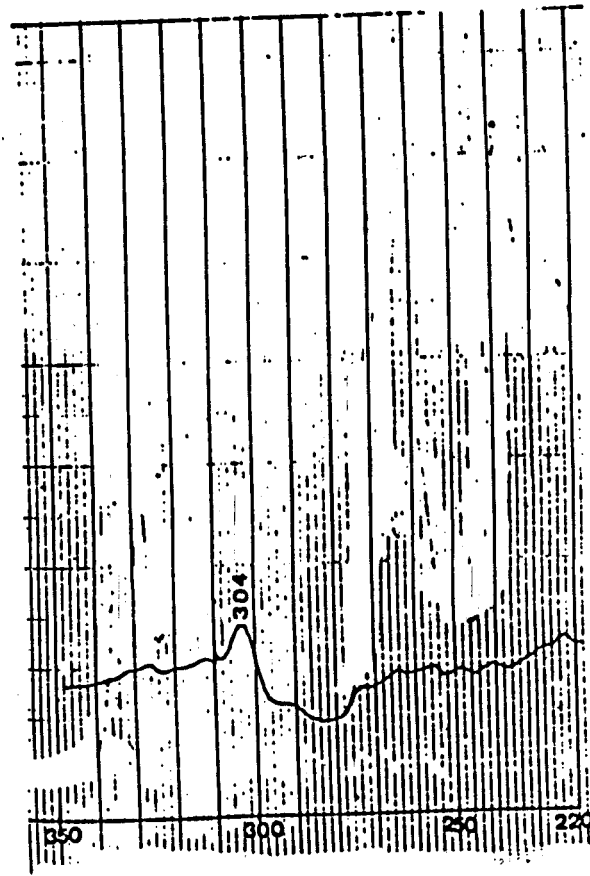


Figura 2
 Fracciones de Sephadex LH-20 eluidas con benceno-metanol



Fracción cloro metileno



Fracción hexano

Figura 3
Fracciones eluidas de Sep-Pack

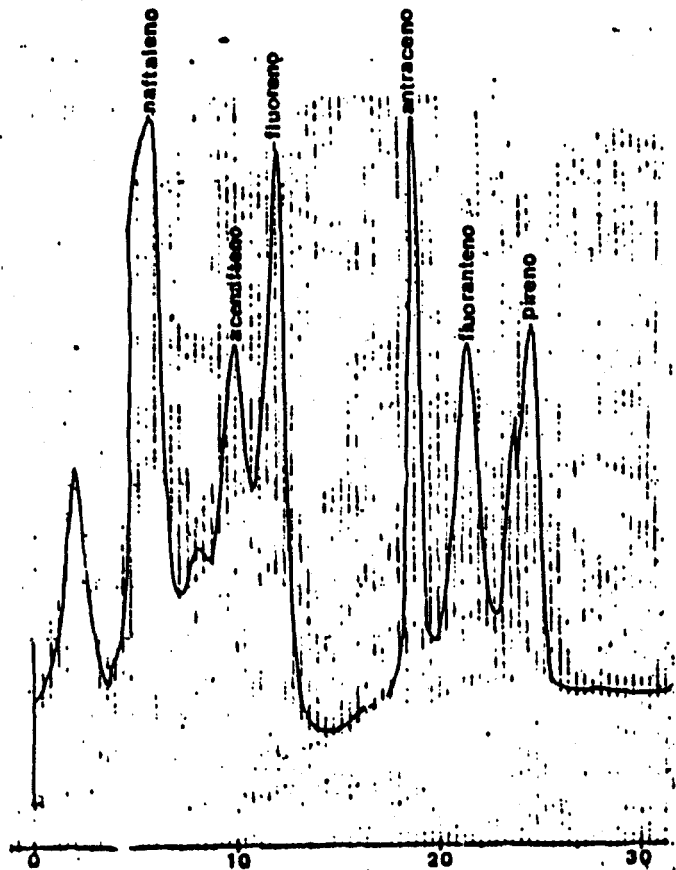
IV.1.2. Técnicas de separación e identificación.

El estudio de las técnicas de separación e identificación se limitó a las dos mayoritariamente propuestas en la literatura : la cromatografía de gases (GC) y de líquidos (HPLC) .

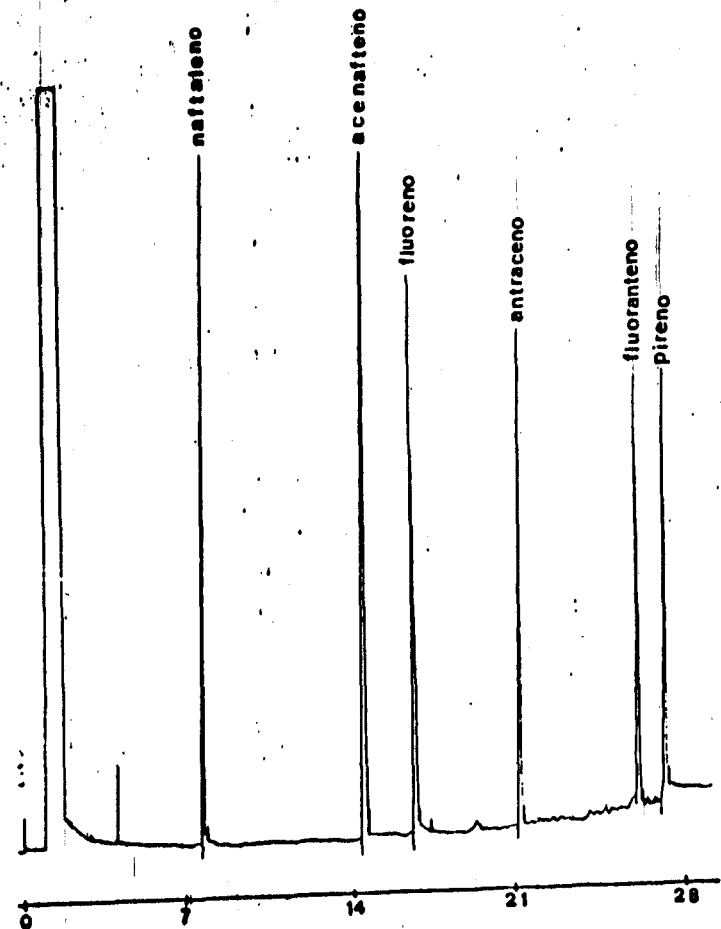
Las condiciones de análisis se eligieron de modo que su duración fuese del mismo orden en los dos casos para eliminar el tiempo como factor determinante de la elección.

Los resultados obtenidos , según las condiciones anteriormente especificadas (Pags 43-46) , se muestran en la figura 4 . La comparación de los dos cromatogramas nos permite realizar las consideraciones siguientes:

- 1) La resolución es aceptable en ambas técnicas
- 2) En la separación por GC hay proporcionalidad entre concentración y área del pico cromatográfico , mientras que por cromatografía líquida no se mantiene dicha proporcionalidad . Así , por ejemplo , el pico de acenafteno tiene menor área que el de antraceno cuando la relación de concentración es inversa entre ellos . Este hecho se debe a que el equipo usado es con detector de ultravioleta de longitud de onda fija , y por ser el coeficiente de extinción molar en cada compuesto diferente según la longitud de onda , el valor de las áreas cromatográficas dependen tanto la concentración del compuesto como de la longitud de onda usada en la



Cromatograma H.P.L.C.



Cromatograma G.C.

Figura 4
 Comparación cromatogramas GC y HPLC (tiempo en minutos)

detección. No obstante , se puede cuantificar determinando el factor de respuesta en estas condiciones , pero hay un riesgo potencial de no detectar aquellos compuestos de concentraciones bajas y/o de coeficientes de extinción inadecuados a la longitud de onda usada en la detección . Este inconveniente se podría obviar obteniendo el cromatograma a varias longitudes de onda en medidas sucesivas , lo que significaría un alargamiento considerable del tiempo de análisis , o bien mediante un detector de barrido continuo de longitudes de ondas asistido por ordenador del que no se disponía.

Por otra parte ,una de las razones argumentadas para el empleo de la cromatografía líquida es que permite análisis a la temperatura de laboratorio mientras que no ocurre así en GC en donde la evaporación en el portal de inyección es causa frecuente de alteración de los componentes de una muestra (Selkirk et al , 1974) . En nuestro caso ,era previsible que no se diera esta circunstancia ya que los componentes de las muestras que pretendíamos estudiar provenían de la combustión de materia vegetal a temperaturas superiores a las del propio portal de inyección.

Por último , la separación por GC ofrece la ventaja decisiva de su posible acoplamiento con la espectrometría de masas que permite la identificación de componentes por los datos simultáneos de su tiempo de retención y sus espectros característicos , obviando en muchos casos la co-cromatografía como método de identificación . Por el

contrario en HPLC no está resuelto satisfactoriamente el acoplamiento con la espectrometría de masas y la identificación necesariamente ha de efectuarse por co-cromatografía.

El conjunto de todas estas circunstancias determinó la elección de GC-MS como método ordinario de separación e identificación de los componentes de las muestras.

IV.1.2.1. Elección de condiciones cromatográficas. Reproducibilidad entre cromatogramas FID e ión total.

En el análisis por GC de una mezcla de patrones con las condiciones seleccionadas para nuestro trabajo, diferentes a las de Lee et al, 1980 en la longitud de la columna, el espesor de la fase estacionaria y la rampa de subida de la temperatura del horno, se obtuvo el cromatograma de la figura 5.

En la tabla E-1 se recogen los índices de retención (I.R.) calculados y los publicados por otros autores. Se observa que las diferentes condiciones cromatográficas inducen desviaciones de 0.9 unidades de I.R. en la zona inicial del cromatograma, siendo aceptable la coincidencia de dichos valores en los restantes compuestos. Igualmente, se comprobó que los valores de los I.R. no se alteraban en los cromatogramas de muestras complejas por lo que se podía utilizar la co-cromatografía como método de

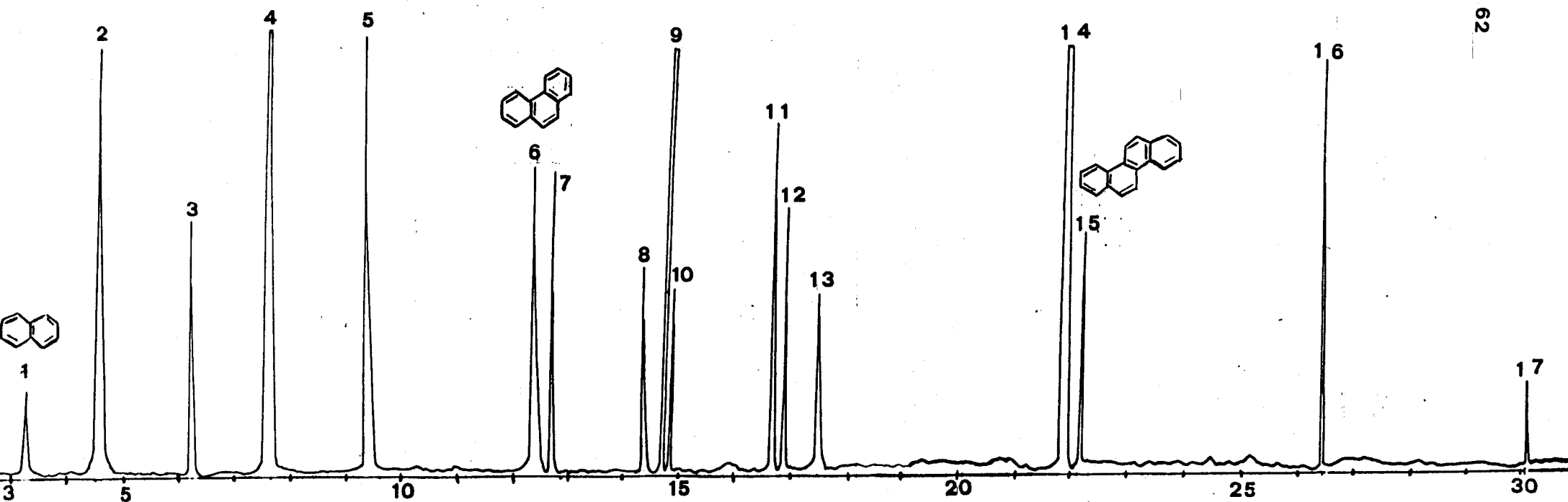


Figura 5
Cromatograma G6 de patrones para el cálculo de los índices de retención

TABLA E-1

| N. Pico | Compuesto | RI Calc. | RI Lee | RI Tong |
|---------|-------------------------|----------|--------|---------|
| 1 | Naftaleno | 200,00 | 200,00 | 200,00 |
| 2 | 2-metilnaftaleno | 217,22 | 218,14 | 217,00 |
| 3 | 2,7-dimetilnaftaleno | 236,51 | 237,71 | ----- |
| 4 | Acenafteno | 250,34 | 251,29 | ----- |
| 5 | Fluoreno | 267,24 | 268,17 | 267,04 |
| 6 | Fenantreno | 300,00 | 300,00 | 300,00 |
| 7 | Antraceno | 301,88 | 301,69 | 301,26 |
| 8 | 3-metilantraceno | 319,58 | 319,46 | 318,90 |
| 9 | 4H-ciclopentafenantreno | 322,57 | 322,08 | 322,15 |
| 10 | 1-metilantraceno | 323,49 | 323,33 | 323,61 |
| 11 | Fluoranteno | 344,76 | 344,01 | 344,43 |
| 12 | 1,2-dimetilfenantreno | 346,18 | ----- | ----- |
| 13 | Pireno | 352,16 | 351,22 | 352,09 |
| 14 | Benz (a) antraceno | 397,82 | 398,50 | 397,55 |
| 15 | Criseno | 400,00 | 400,00 | 400,00 |

identificación de componentes individuales .

En la figura 6 se muestran los cromatogramas de FID e ión total de una muestra compleja (con columnas y condiciones idénticas) , pudiéndose observar una excelente reproducibilidad entre los mismos , lo que permite acumular los cálculos de los R.I. con los espectros de masas al identificar los compuestos .

IV.1.3. Evaluación de diferentes protocolos.

Se compararon los tres protocolos reseñados en material y métodos (Pags 36 - 41). Las diferencias fundamentales entre ellos estriban en la forma de realizar la extracción de la muestra y en el número y tipo de manipulaciones necesarias para el fraccionamiento y purificación del extracto original . Los resultados globales obtenidos al aplicarlos a un soporte mineral con la mezcla de sustancias modelos "C" se muestran en la figura 7 , siendo las proporciones de áreas de los distintos componentes , con respecto a la disolución usada en el repicado , las siguientes :

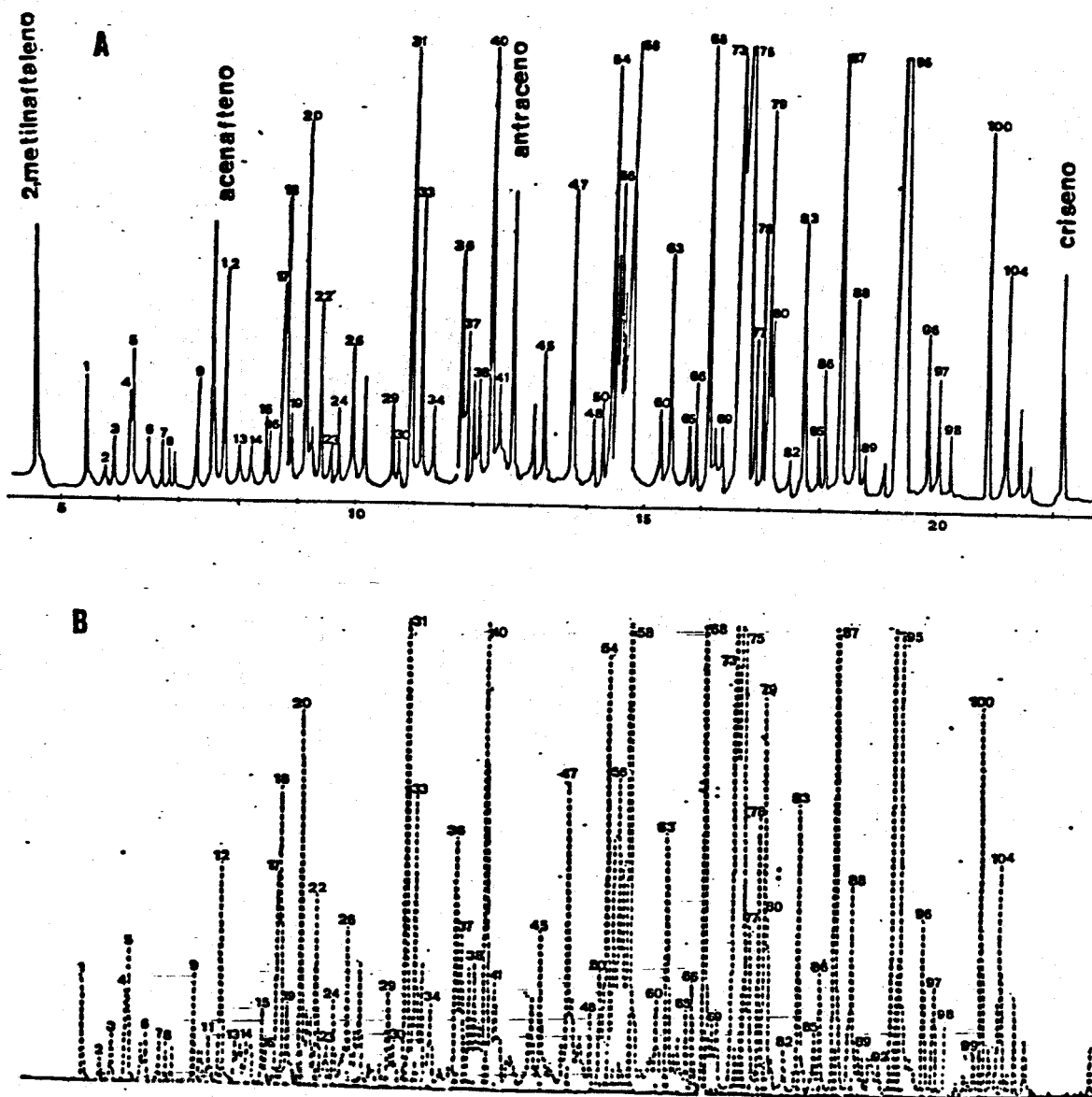


Figura 6

Comparación cromatogramas FID (A) e ión total (B)

| Compuesto | Vassilaros | Giger-Schaff. | EPA-modif. |
|-----------------|------------|---------------|------------|
| Naftaleno | 56 % | 70 % | 78 % |
| 2,met,Naftaleno | 61 % | 74 % | 96 % |
| Acenafteno | 70 % | 83 % | 95 % |
| Fluoreno | 78 % | 86 % | 94 % |
| Antraceno | 77 % | 85 % | 91 % |
| 2,met,antraceno | 73 % | 82 % | 93 % |
| Pireno | 79 % | 87 % | 102 % |

De estos resultados podemos obtener las conclusiones genéricas siguientes :

1) En ningún caso hay pérdidas cualitativas de componentes , lo que parece indicar que las discriminaciones son de carácter cuantitativo.

2) En todos los casos hay pérdidas cuantitativas, existiendo una correspondencia entre el número de manipulaciones necesarias para el fraccionamiento y purificación del extracto en cada protocolo y las discriminaciones cuantitativas observadas.

Mediante el estudio de los cromatogramas de las disoluciones obtenidas en las distintas operaciones de cada protocolo , no mostrados aquí, se comprobaron los siguientes hechos :

1) En el protocolo de Vassilaros-modificado las pérdidas mayores se producían en la extracción con el medio acuoso alcalino , durante las extracciones líquido - líquido con cambios de pH y en la eliminación del eluyente de la columna de Sephadex LH-20.

2) En el protocolo de Giger-Schaffner los errores se

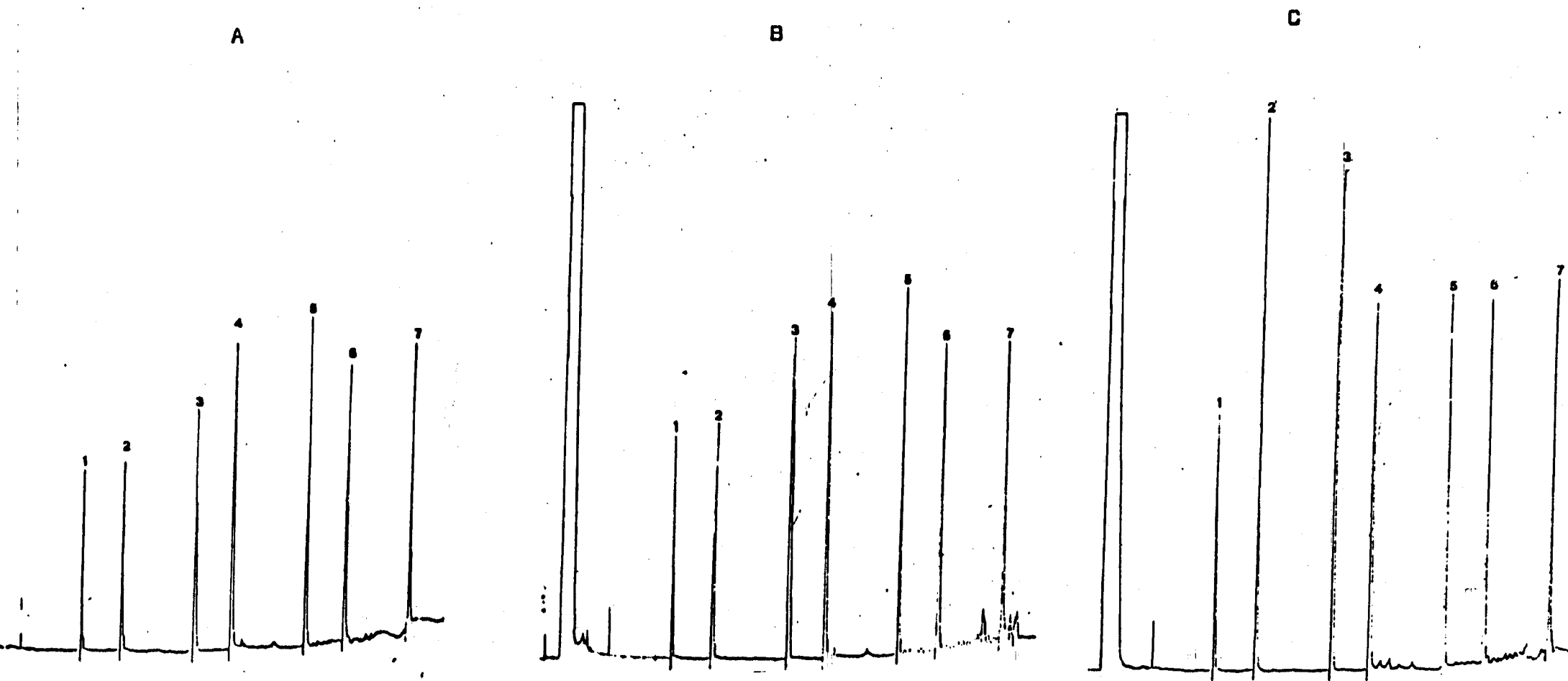


Figura 7

Cromatogramas FID de métodos de extracción de Vasculares (A), Giger-Schaff.(B) y EPA-mod.(C)

producían en la extracción en Soxhlet , no era completa , y en la eliminación del eluyente de la columna de Sephadex LH-20

3) En el protocolo EPA-modificado se detectaron pérdidas en el extracto original de cloruro de metileno sin que mejorara la situación cuando se repetían las extracciones en el baño de ultrasonidos , y por ello pensamos que lo mas probable es que las pérdidas se deban a fenómenos de sublimación durante dicho proceso. En todo caso , con este protocolo se minimizaban los errores cuantitativos y por eso se eligió para el estudio de las muestras .

IV.1.4. Aplicabilidad del protocolo elegido a las muestras estudiadas.

Para determinar la aplicabilidad del protocolo elegido a las muestras se estudió la reproducibilidad , cualitativa y cuantitativa , mediante la repetición del procedimiento analítico con una misma muestra en dos análisis independientes . De los cromatogramas obtenidos , mostramos en la figura 8 un ejemplo representativo , correspondiente a la muestra del incendio de un pinar después de dos años , y en el que podemos destacar los siguientes aspectos :

1) La reproducibilidad cualitativa es muy buena ya que sólo se produce discriminación en picos de área muy

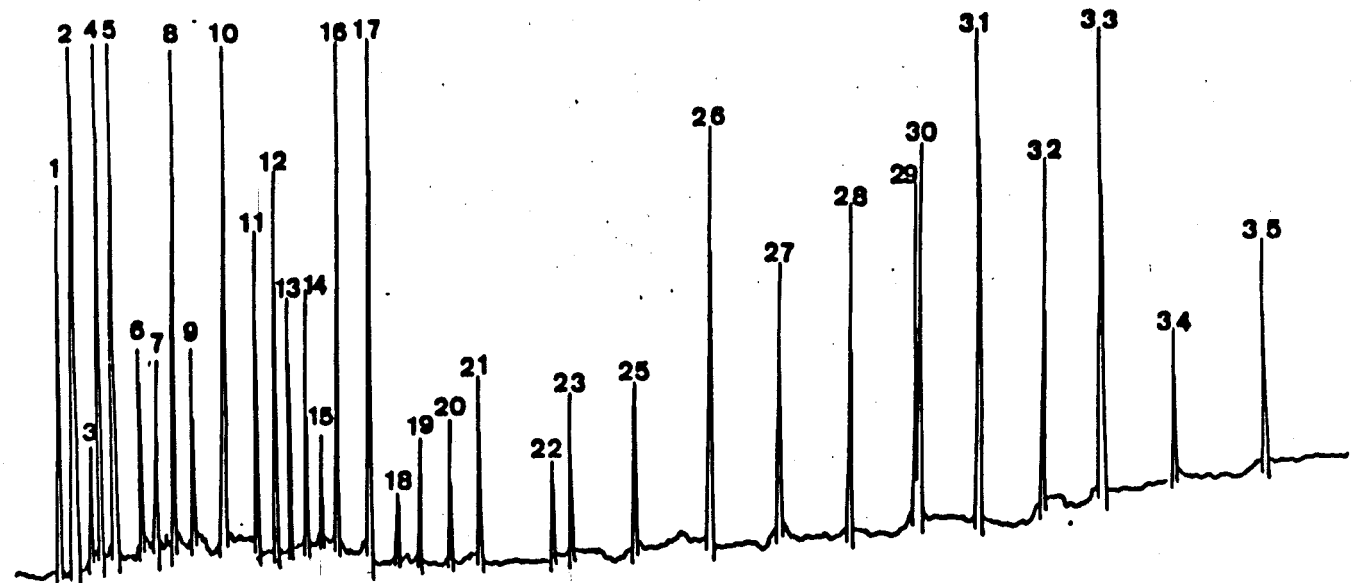
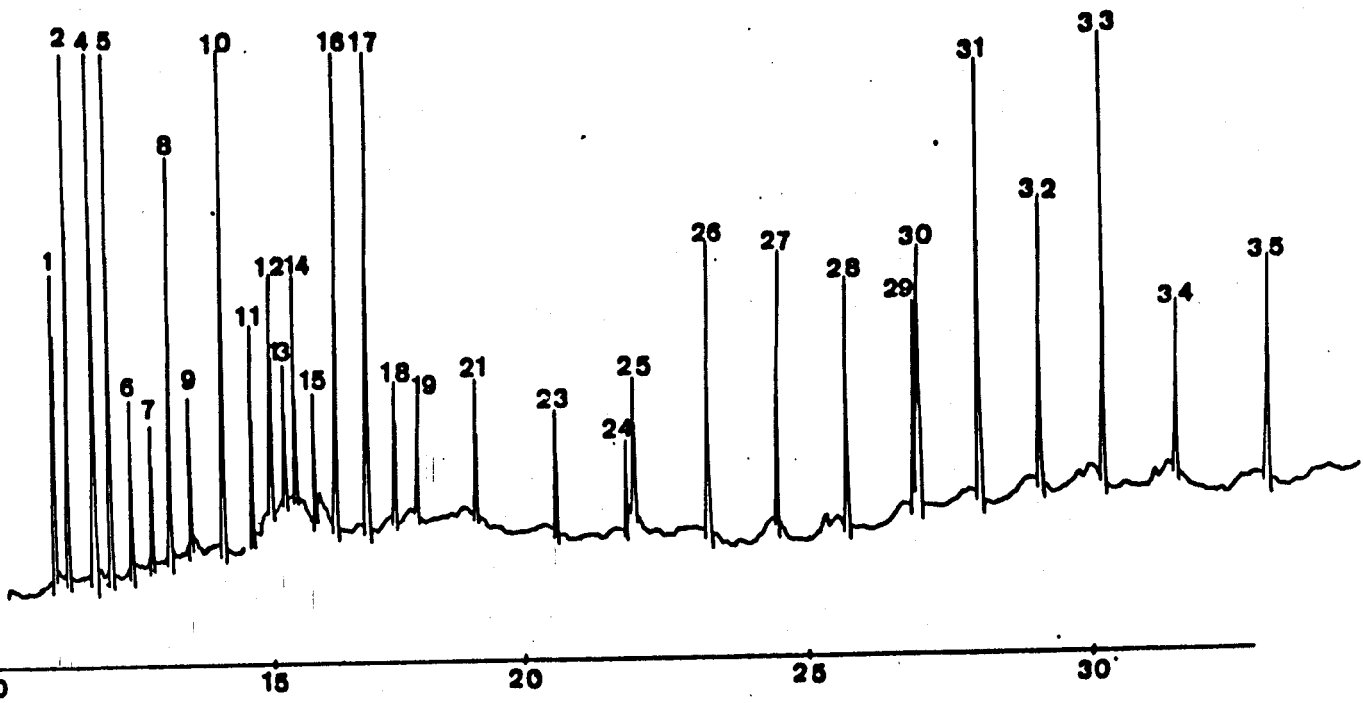


Figura 8

pequeña , como por ejemplo los picos números 3 , 20 , 22 y 24 de dicha figura .

2) La reproducibilidad cuantitativa variaba con la importancia de los picos en el perfil cromatográfico , y así en el caso de la muestra de referencia , los componentes mayoritarios (picos números 1 , 2 , 4 , 5 , 10 , 16 , 17 , 31 y 33) reproducían las áreas con desviaciones no superiores al 15 % , los componentes de importancia media lo hacían con desviaciones entre 20 - 40 % (picos números 11 , 12 , 13 , 14 , 26 , 27 , 28 , 29 , 30 , 32 y 35) y los componentes minoritarios presentaban desviaciones de áreas entre 40 y 60 % (picos 3 , 6 , 7 , 9 , 15 , 18 , 21 , 22 , 23 , 25 y 34).

Estos resultados indicaban que los errores cuantitativos de los compuestos minoritarios eran importantes , y por tanto parecía obligado buscar un procedimiento alternativo que permitiera su cuantificación. Se ensayaron dos procedimientos : 1) realizar la extracción en mayor cantidad de muestra y 2) forzar las condiciones cromatográficas disminuyendo la dilución del extracto inyectado o variando la atenuación del cromatógrafo. En los dos casos encontramos la misma dificultad : se distorsionaba la línea base en la zona central del cromatograma y sólo se lograba cuantificar con menores desviaciones de reproducibilidad en las áreas algunos compuestos del principio y del final del cromatograma . Sin embargo , estos ensayos permitieron que detectásemos en las muestras unos compuestos que no aparecían en los cromatogramas ordinarios

y que por sus previsibles bajísimas concentraciones les denominamos trazas. Como ejemplo ilustrativo de este hecho en la figura 9 se presentan los cromatogramas de ión total , en condiciones ordinarias y forzadas , de la muestra de boliche de madera de alcornoque , en donde las letras indican compuestos trazas de distinta naturaleza identificados mediante la inyección de la muestra en condiciones forzadas .

El conjunto de todos estos datos permite que podamos afirmar que las características de la aplicabilidad del protocolo a las muestras objeto de estudio son las siguientes :

1) La reproducibilidad cualitativa en condiciones cromatográficas ordinarias es buena para los compuestos de alta , mediana y baja concentración ,siendo necesario forzar las condiciones cromatográficas para detectar los compuestos trazas de concentraciones relativas muy bajas.

2) La reproducibilidad cuantitativa sólo es aceptable para compuestos de concentraciones alta y mediana

3) Los compuestos de concentraciones bajas no se pueden cuantificar en sentido estricto por lo que sus concentraciones deben tomarse con carácter indicativo.

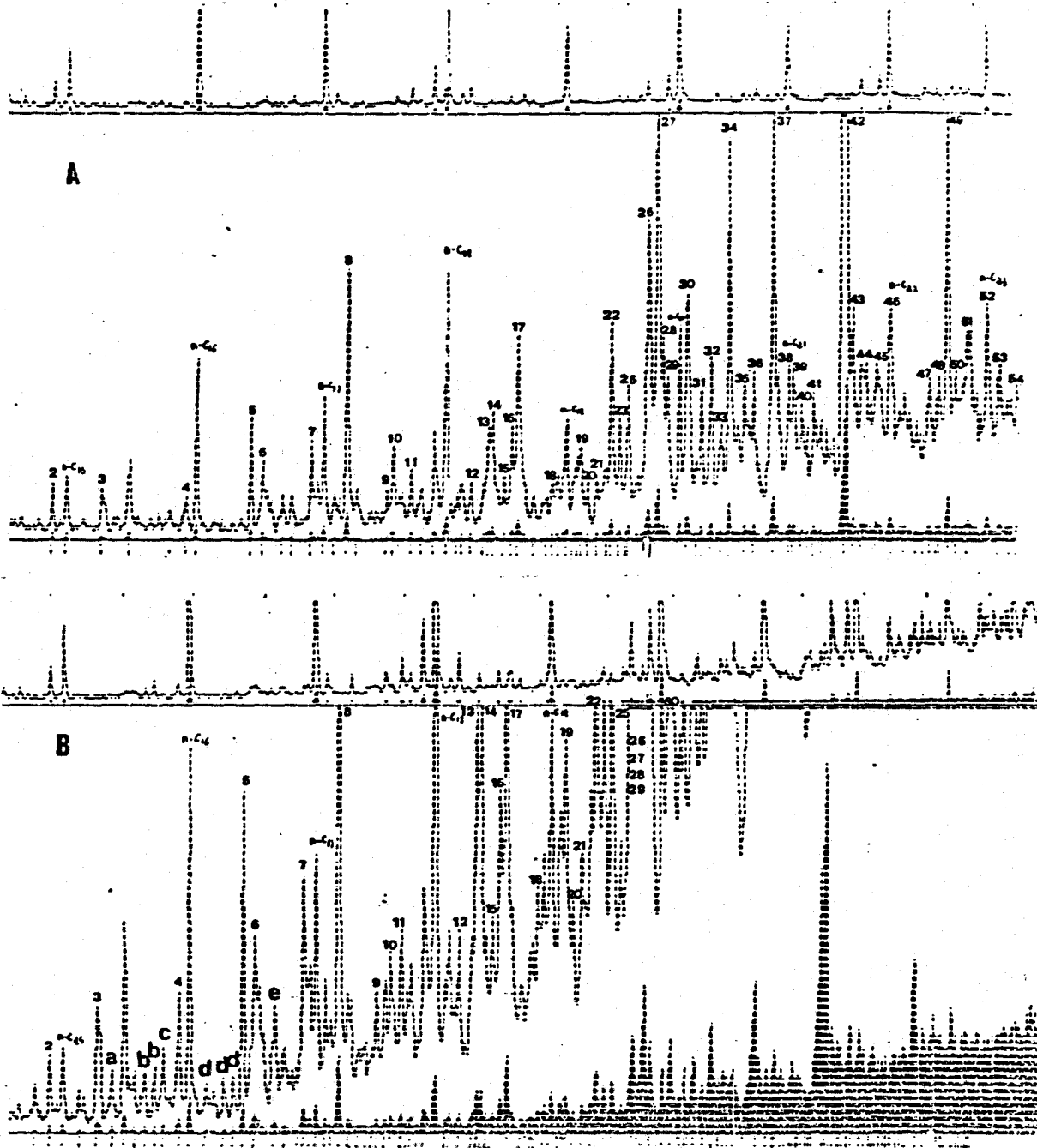


Figura 9

Comparación cromatogramas ión total en condiciones normales (A) y forzadas (B)

IV.1.5. Evaluación de los métodos de identificación de los componentes individuales de las muestras .

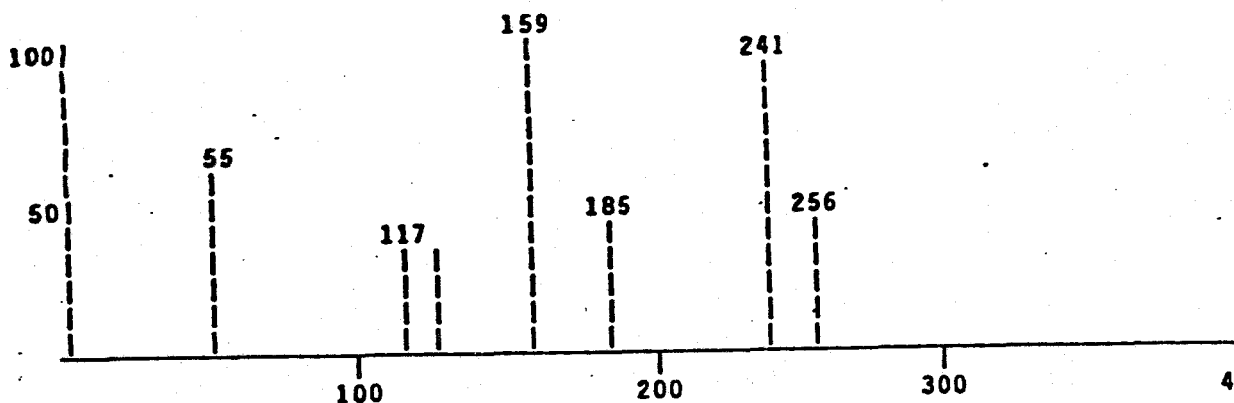
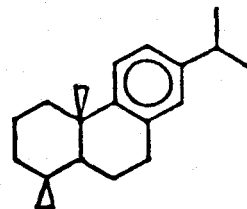
En la identificación de compuestos en GC-MS es frecuente que la intensidad relativa de los iones característicos del espectro de masa de una sustancia varíe con las condiciones de trabajo impuestas por el diseño de un determinado aparato. En el caso de los C.P.A. comprobamos que esta circunstancia no se daba salvo en los derivados alquílicos e hidroaromáticos. Así, por ejemplo, ocurría en el caso de dehidroabietin que se presenta en la figura 10. Por esta razón se usaron sustancias modelos, en la medida de lo posible, para determinar los espectros de los compuestos de especial significación en las muestras y que iremos detallando en el estudio de cada una de ellas.

En la identificación con detector FID se usó la co-cromatografía y el cálculo de los RI, ya que la imposibilidad de disponer de todas las sustancias modelos imponía restringir los mayores márgenes de seguridad a los compuestos de especial significación en las muestras. No obstante, el uso de los RI combinado con los espectros de masas permite asignar con razonable seguridad la naturaleza de los distintos componentes. Así, por ejemplo, para los compuestos di y trimetilados del naftaleno solo disponíamos de las sustancias modelos 2,7-dimetilnaftaleno, 1,6-dimetilnaftaleno y 2,3,6-trimetilnaftaleno, pero el estudio comparativo de los RI de la serie detectada en las

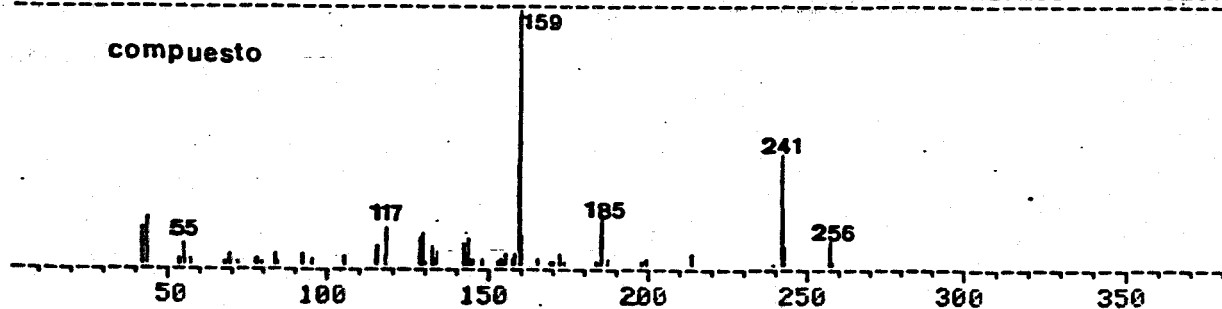
Dehidroabietina (Simonsit y Mazurek , 1982)

(C19 H28) Mw=256

| | | | | | | | |
|--------------|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|
| Fragmentos : | 159 | 241 | 55 | 256 | 185 | 117 | 129 |
| Abund.rel.: | 100 | 90 | 50 | 32 | 32 | 29 | 20 |



** Spectrum 179, Disk ID 11 ** Sample # 143 Retention Time 16.20 m
 Scanned from 40 to 600 amu Number of Peaks Detected = 54
 File type = processed
 Base Peak = 159.2 Base Peak Abundance = 1212 Total Abundance = 5207



** Spectrum 117, Disk ID 11 ** Sample # 67 Retention Time 16.24 m
 Scanned from 40 to 600 amu Number of Peaks Detected = 87
 File type = processed
 Base Peak = 159.2 Base Peak Abundance = 2056 Total Abundance = 11162

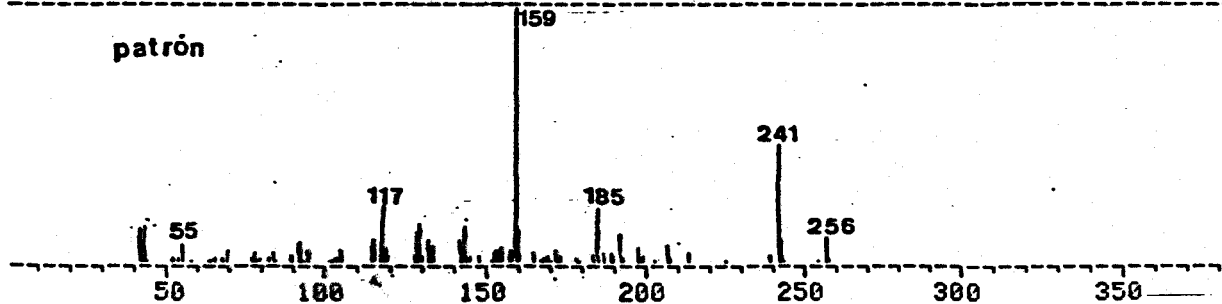


Figura 10

muestras permite distinguir los distintos isómeros tal como se presenta en la tabla siguiente :

| Compuesto | RI calculado | RI de Lee et al, 1979 |
|-------------------------|--------------|-----------------------|
| 2,7-dimetilnaftaleno | 236,51 | 237,71 |
| 1,3-dimetilnaftaleno | 238,74 | 240,25 |
| 1,7-dimetilnaftaleno | ----- | 240,66 |
| 1,6-dimetilnaftaleno | 239,35 | 240,72 |
| 2,3-dimetilnaftaleno | 241,98 | 243,55 |
| 1,4-dimetilnaftaeno | ----- | 243,57 |
| 1,5-dimetilnaftaleno | 244,22 | 244,98 |
| 1,2-dimetilnaftaleno | 245,43 | 246,49 |
| 1,8-dimetilnaftaleno | ----- | 249,52 |
| 2,3,6-trimetilnaftaleno | 262,47 | 263,31 |

IV.2. Contenidos en materia orgánica,
material lipídico y CPA de las
muestras.

Entre las distintas muestras estudiadas varían, como veremos en detalle más adelante, los perfiles cualitativos y cuantitativos de los CPA detectados. Previamente, sin embargo, haremos una discusión genérica de la significación cuantitativa de la fracción global de CPA en función de la materia orgánica de las muestras, un parámetro en el que se reflejan claramente los efectos del fuego y las diferentes condiciones en las que se produce la combustión del material vegetal.

Los efectos del fuego sobre propiedades fisico-químicas y erosibilidad del suelo, la vegetación, las modificaciones en los ciclos biogeoquímicos de nutrientes, y la biocenosis edáfica han sido descritos en numerosos trabajos, recientemente revisados, en lo que se refiere a la aportación española, por Vega, 1986.

Dichos efectos son difíciles de evaluar en condiciones naturales por el número y complejidad de los procesos que tienen lugar simultáneamente en un incendio. En el caso del humus, los cambios que experimenta en su composición han podido discernirse, dentro de grandes limitaciones, mediante experiencias de simulación de incendios en laboratorio. Así, han podido reconocerse fenómenos de acumulación y fijación de sustancias hidrofóbicas y la formación de horizontes

impermeables (Savage, 1974; DeBano et al., 1970, 1976; Giovannini y Luchessi, 1983, 1984), y fenómenos de reorganización (alteración y mineralización selectiva) de las fracciones húmicas del suelo (Almendros et al., 1986).

En la tabla Mo-1 se presentan los contenidos en materia orgánica de las muestras, el reparto de la misma en diferentes fracciones, según el esquema de extracción y enriquecimiento seguido, y los respectivos porcentajes relativos en CPA.

En primer lugar es destacable el significativo aumento en C orgánico total que se observa en los suelos recién quemados respecto de los correspondientes testigos. Tanto el suelo de incendio de pinar como el de quema de rastrojera aumentan en un factor > 8 sus contenidos en materia orgánica (MO).

Sobre este dato, el contenido en MO, existen notables discrepancias en la bibliografía, y así, mientras algunos autores (Diaz Fierros et al., 1982; Ibañez et al., 1983) señalan aumentos de MO en suelos quemados en comparación con los testigos, la observación más generalizada (Viro, 1974; Plata y Guitian, 1966; Bara y Vega, 1984; Sanroque et al., 1985; Giovannini et al., 1987) es una disminución acusada de la MO en proporciones variables (hasta de un 20%) dependiendo de las condiciones (temperatura alcanzada, duración, climatología, etc.) en las que se produjo el incendio. Esta contradicción puede deberse a que los datos se refieren a casos de incendios muy diferentes, pero principalmente a la falta de homogeneidad en el grosor de la

Tabla Mo-1

Contenidos en carbono orgánico, lípidos y CPA de las muestras

| muestras | C org. total mg/g | lípidos ClMe mg/g | fr.soluble isooctano µg/g | alcanos fr.hexano ng/g | CPA fr.ClMe ng/g | %CPA en lípidos |
|----------|-------------------------|-------------------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------|
| STIP | 5,70 | 0,38 | 2,03 | 660 | 797 | 0,20 |
| SIP | 40,81 | 0,48 | 4,60 | 1865 | 2376 | 0,49 |
| SIP-2 | 21,53 | 0,43 | 3,70 | 1442 | 1801 | 0,41 |
| STR | 4,95 | 0,08 | 2,55 | 1450 | 53 | 0,06 |
| SIR | 47,54 | 0,12 | 4,10 | 3560 | 231 | 0,19 |
| CIS | 45,51 | 0,22 | 6,20 | 5340 | 612 | 0,27 |
| SHP-100 | 14,00 | 0,10 | 1,90 | 538 | 167 | 0,16 |
| SHP | 88,50 | 0,23 | 10,20 | 7580 | 2730 | 1,18 |
| SCBP | 113,50 | 0,16 | 23,20 | 16120 | 6302 | 3,93 |
| CP | 503,50 | 0,30 | 3,60 | 3610 | 1402 | 0,46 |
| SCBE | 95,00 | 0,26 | 2,90 | 2010 | 143 | 0,05 |
| CE | 599,56 | 0,09 | 2,00 | 1824 | 110 | 0,12 |
| SCBA | 93,06 | 0,68 | 15,60 | 10060 | 3179 | 0,46 |
| CA | 478,10 | 0,18 | 2,80 | 1850 | 548 | 0,30 |

capa de suelo afectada por el fuego muestreada para el análisis y, en algunos casos, a la utilización de métodos inadecuados de cuantificación de MO.

En nuestro caso, los aumentos en C orgánico se han detectado en la capa de 0-10 cm., donde el humus está compuesto no sólo de la vegetación de cubierta (hasta 5 cm.), restos muertos, que se destruye completamente por el fuego, a excepción de especies con órganos regenerativos subterráneos que pueden sobrevivir, sino también por una parte de humus estabilizado que cuantitativamente no se altera por el fuego. Esta capa, de acuerdo con Almendros et al., 1986, se enriquecería en C orgánico como consecuencia de la incorporación al suelo de material procedente de la destilación térmica seca de la cubierta vegetal fresca. Se ha comprobado que dicho material es de naturaleza hidrofóbica (Sholl, 1971) como se refleja, en parte, en los incrementos en peso de la fracción lipídica.

A medida que transcurre el tiempo tras el incendio, los contenidos en C orgánico van disminuyendo, y las diferencias entre los suelos quemados y los testigos van siendo menores. Esta tendencia, también observada en otros trabajos (Giovannini et al., 1987), se aprecia en especial comparando la hoguera reciente de pinos (SHP) con la realizada mucho tiempo antes (SHP-100).

En las demás muestras destaca la notable acumulación de MO que se produce en las tierras de cubierta de los hornos de producción de carbón vegetal, aunque en proporciones ligeramente divergentes ($P > E > A$) a los contenidos en C de los

respectivos carbones (E>P>A).

El contenido en peso de material lipídico de las muestras, representado por la fracción de MO soluble en ClMe, no es muy variable en el conjunto de las muestras, aunque se observan entre ellas diferencias significativas. Así, el suelo testigo del incendio de pinar (STIP) contiene cuatro veces más lípidos que el muestreado para controlar los efectos de la rastrojera y la ciscada (STR), de acuerdo con la diferente cantidad y naturaleza de la cubierta vegetal fresca en cada caso, e igualmente, entre los suelos de cubierta de los boliches (que presentan valores en relación inversa con los respectivos contenidos en C total) y los carbones producidos en dichos hornos los valores son muy variables.

Como avanzamos anteriormente, los contenidos en lípidos aumentan en las muestras quemadas en relación con los testigos debido al aumento de MO libre por caída de hojas muertas y acumulación de necromasa parcialmente quemada, fenómeno que no ha sido observado en muestras quemadas bajo condiciones de laboratorio (Almendros et al., 1986). En cuanto a la variación con el tiempo, el contenido en material lipídico en el suelo del incendio del pinar sólo es ligeramente inferior al cabo de los dos años, como consecuencia de la recuperación de la cubierta vegetal, mientras en el caso de la hoguera abierta de leña de pino la diferencia entre la muestra reciente y la antigua es muy acusada, ya que en este caso el suelo soporte, de naturaleza arenosa, permanece prácticamente desprovisto de vegetación.

De forma genérica, las distintas tendencias obedecen a los diferentes contenidos de material hidrofóbico presentes en las muestras de forma natural o generado in situ, y a la relativa proporción de componentes específicamente solubles en ClMe que forman parte de ese material. De hecho, aunque los componentes básicos de la madera son ligninas, hemicelulosas y celulosas, las distintas especies vegetales contienen diferentes proporciones de ácidos grasos y ω -hidroxiácidos (Herbin y Sharma, 1969), polifenoles (Hillis, 1967), sesquiterpenos (Gleizes et al., 1984; Gaydon et al., 1986), lignanos (MacRae y Towers, 1984), e incluso de CPA como metabolitos naturales (Ciusa y Morgante, 1979).

Con ClMe se produce ya la extracción preferencial de un tipo de lípidos, que a su vez es sólo parcialmente soluble en otro disolvente, ya que la composición del extracto es necesariamente heterogénea y existen grandes diferencias en solubilidades entre series homólogas de compuestos, no regidas exclusivamente por la polaridad del disolvente. Este tipo de rectificación se lleva a cabo mediante la evaporación del primer extracto a sequedad y la reextracción del residuo con un segundo disolvente en el que parte del material originalmente extraído no se disuelve, y es necesaria en la preparación de muestras lipídicas de origen biológico o medioambiental cuando se pretende eliminar interferencia de algún tipo de componentes no deseado (Schmid y Hunter, 1971).

En nuestro caso, como se observa en la tabla Mo-1, la fracción de material lipídico soluble en isooctano es

cuantitativamente de un orden de magnitud 100-1000 veces inferior al total de extracto en ClMe. El material que permanece insoluble está compuesto por ácidos grasos, mono-, di- y triglicéridos y otros componentes lipídicos no identificados, mientras permanece en solución una mezcla compleja de hidrocarburos, que posteriormente se fraccionó por cromatografía de adsorción. La proporción de material insoluble en isooctano varía apreciablemente entre las distintas muestras. En las procedentes de la quema abierta de biomasa en pequeñas cantidades (CIS, SHP) y en las tierras de cubierta de los boliches el precipitado de material graso observado fué menor, y por ende son las que contienen mayor proporción de hidrocarburos alifáticos y aromáticos.

La suma de n-alcenos y CPA no coincide con el total de material soluble en isooctano, debido a que en algunas muestras se produjo una ligera retención de componentes de la fracción cromatografiada en la matriz del adsorbente, y en otros casos aparecen en las fracciones de alcanos y CPA algunos compuestos no identificados que no se han cuantificado. Tampoco existe una correspondencia entre los contenidos en CPA y el total de hidrocarburos, y así, por ejemplo, las muestras SIP, SIP-2 y CP contienen más CPA que la muestra CIS, y la CA contiene más CPA que la SIR, siendo mucho menor el contenido de fracción soluble en isooctano de la primera.

A excepción de las muestras de los incendios de pinar, en todas las demás es mayor el contenido de alcanos que de

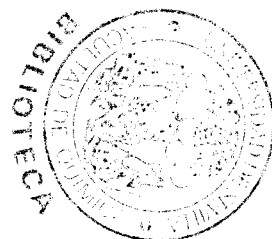
CPA. Estos últimos, objetivo de estudio del trabajo, presentan una serie de tendencias bien reconocibles. Así, es evidente su formación en procesos térmicos a partir de precursores biológicos, ya que su presencia en los suelos quemados aumenta significativamente en comparación con los correspondientes testigos : en un factor de 3 en el incendio de pinar y de 5 a 10 en la rastrojera y la ciscada.

La proporción de CPA desciende, por otra parte, a medida que transcurre el tiempo, como se aprecia en los dos casos en que se ha estudiado la influencia de este factor, debido probablemente a pérdidas por procesos de alteración metabólica o de tipo fisico-químico, además del lavado hacia capas inferiores del perfil.

Es muy notable la acumulación de hidrocarburos, y de CPA en particular, en las tierras de cubierta de los boliches de pino y alcornoque (SCBP, SCBA) aunque no en la de eucalipto (SCBE), muestra en la que se observó el mayor precipitado de material graso al realizar la rectificación del extracto total con isooctano. Igual tendencia se observa al comparar los contenidos de CPA en los carbones vegetales, lo que indica la diferencia de comportamiento ante el fuego de distintas especies vegetales.

Finalmente, en cuanto a la proporción de CPA respecto del total de fracción lipídica, se observa también que tras los incendios se produce una acumulación notable de los mismos en los respectivos suelos soporte. Este impacto se discutirá más adelante al analizar por separado aquellos casos en los que el fenómeno puede tener relevancia

medioambiental, es decir afectar a áreas amplias (incendios de masa forestal y rastrojera) y/o suponer presencia de los CPA más significativos desde el punto de vista contaminante.



IV.3. Naturaleza de los C.P.A. de las muestras.

Origen de los diversos tipos de C.P.A. e hipótesis sobre sus vías de formación.

En todas las muestras se estudiaron las fracciones de n-hexano y cloruro de metileno . En la primera se identificaron fundamentalmente alcanos y sólo se discutirán el perfil de los mismos y sus concentraciones relativas como método complementario para dilucidar las condiciones de combustión de algunas muestras . En la fracción de cloruro de metileno se identificaron los C.P.A. característicos de las distintas muestras , cuya naturaleza y génesis analizaremos detenidamente a continuación .

En cada caso se presentan los cromatogramas de ión total , correspondiendo los números sobre los picos cromatográficos , ordenados por tiempo de retención creciente en el conjunto de todas las muestras , a los compuestos identificados que se recogen en las tablas . Los señalados con interrogante son compuestos cuya identificación se ha establecido tentativamente , ya que sus espectros de masas no aparecían citados en la bibliografía ni en las librerías manejadas , y su detección es original . Los compuestos que aparecen en cada tabla sin referencia a un número de pico cromatográfico son aquellos que se identificaron forzando las condiciones cromatográficas y no se pudieron cuantificar , tal como ya se ha expuesto anteriormente.

Las concentraciones de los componentes individuales

están expresadas en nanogramo por gramo de muestra seca (ng/g), tal como se hace habitualmente en la bibliografía, y cuando sus valores son inferiores a 20 ng/g hay que tomarlos en el sentido restrictivo que se ha señalado en la evaluación del procedimiento de análisis (Pag 71).

Para interpretar los resultados se considerarán todos los posibles procesos de la combustión de biomasa que pueden originar C.P.A., ya que la existencia, en nuestro caso, de diferentes condiciones hacía presumir que se dieran una serie de hechos comunes, procesos básicos, y algunas circunstancias diferenciadoras que podemos denominar procesos específicos. Como se ha expuesto anteriormente, los procesos básicos son la transformación de componentes vegetales, tales como sesquiterpenos, derivados de los ácidos resínicos (abiético y pimárico) y esteroides, y la formación de otros C.P.A. por pirólisis de n-alcenos. En cuanto a los posibles procesos específicos, es conocido, por ejemplo, que el calentamiento prolongado de sustratos vegetales provoca no solo la transformación de sustancias existentes en los mismos sino también su isomerización térmica y/o la desalquilación parcial de los núcleos estructurales correspondientes (Ishiwatari y Fukushima, 1979); de ahí que la duración de la combustión pueda ser considerado como un factor desencadenante de procesos específicos. De la misma manera, las condiciones de aireación controlan tanto la temperatura de combustión como el grado de transformación en dióxido de carbono y ello puede significar cantidades de C.P.A. distintas de las

esperadas bien por una mayor transformación en dióxido de carbono o por enriquecimiento de los humos de los incendios en sustancias de baja volatilidad que en otras circunstancias no se incorporarían a los mismos (Ramdahl , 1983) .

IV.3.1. Incendios de masas forestales de pinos.

En las figuras 11 , 12 y 13 se muestran los cromatogramas de ión total de las fracciones de cloruro de metileno de las muestras de suelo testigo de pinar (STIP), de suelo de pinar incendiado (SIP) y de suelo de pinar incendiado después de dos años (SIP-2) respectivamente , reconociéndose la naturaleza y cuantificación de sus componentes individuales en la tabla R-1 .

Los compuestos números 29 , 42 , 56 , 61 , 73 , 85 , 90 , 92 , 97 , 103 , 111 , 115 , 116 , 121 , 126 , 130, 133 y 139 se identificaron por comparación de sus tiempos de retención y espectros de masas con sustancias modelos.

Los compuestos números 78 , 100 , 108 y 122 se identificaron mediante el cálculo de los RI correspondientes.

De los compuestos números 54 , 60 , 63 , 70 , 77 , 94 , 105 , 117 , 118 , 134 , 135 , 138 , 144 , 146 y 147 sólo pudo precisarse que se trataba de isómeros de compuestos identificados , ya que tanto los espectros de masas como las variaciones en los tiempos de retención eran los normales para estos casos , pero no se logró determinar su

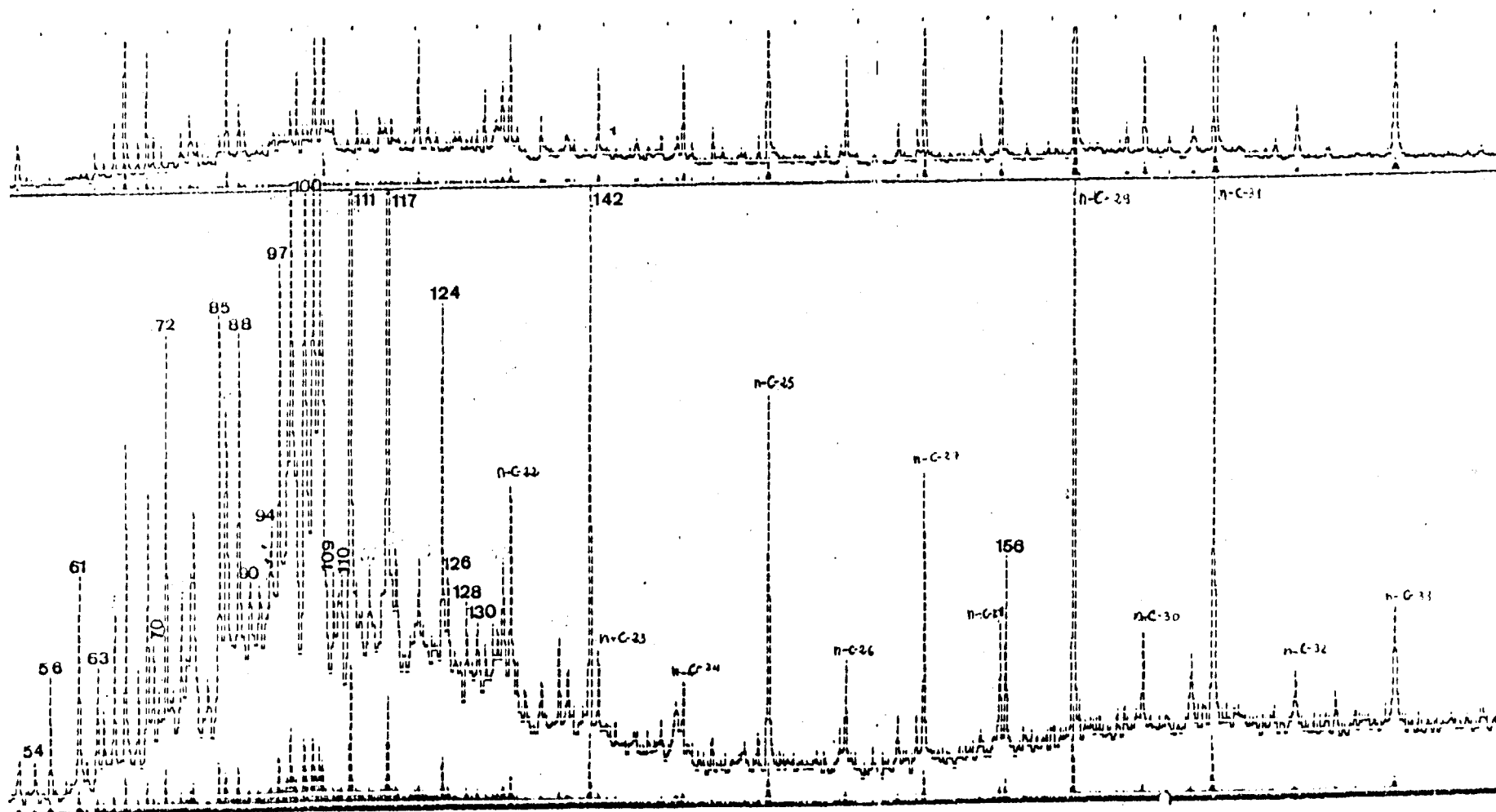


Figura 11

Cromatograma de ión total de la muestra STIP. Fracción cloruro de metileno

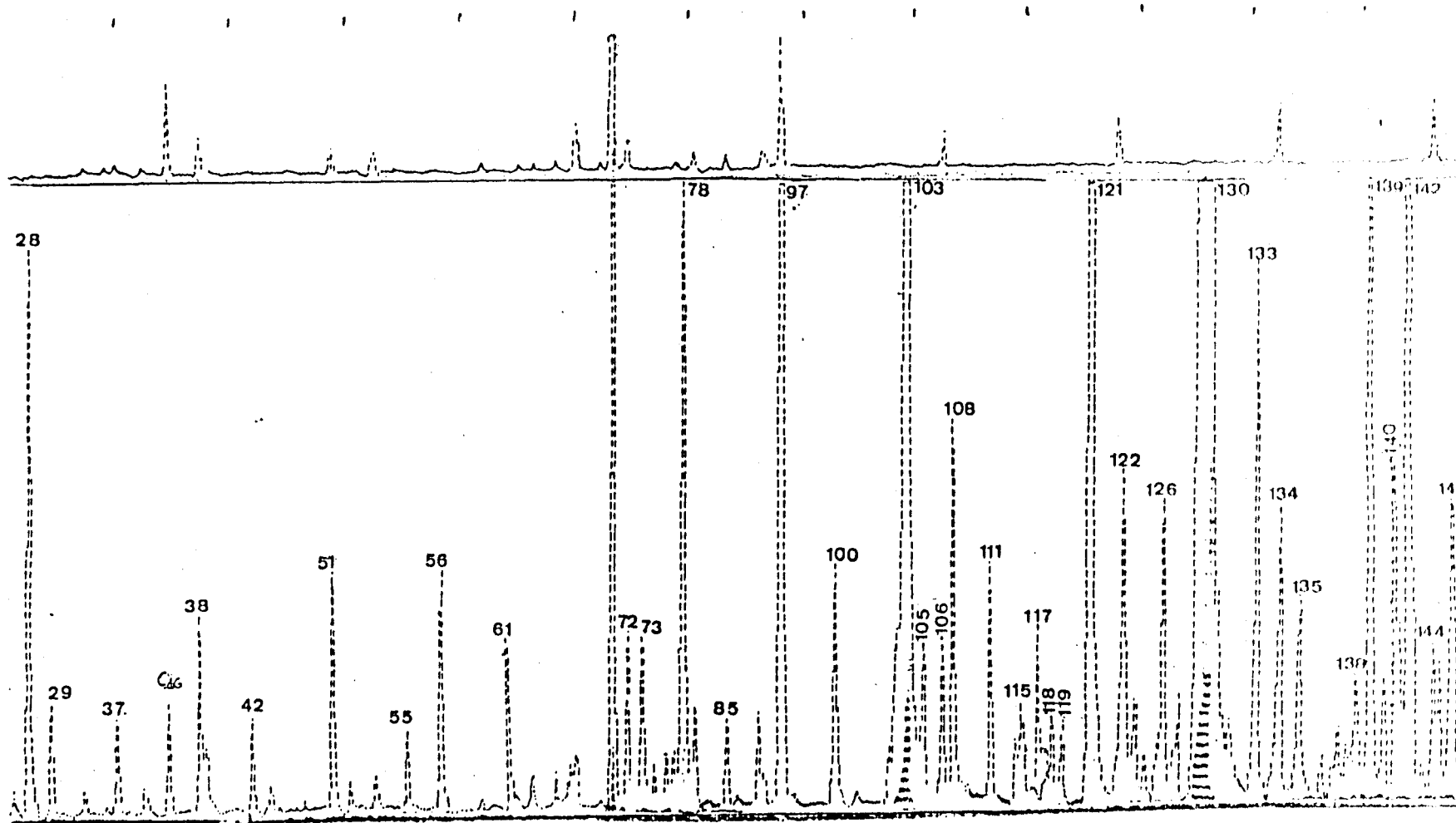


Figura 12

Cromatograma de ión total de la muestra SIP. Fracción de cloruro de metileno

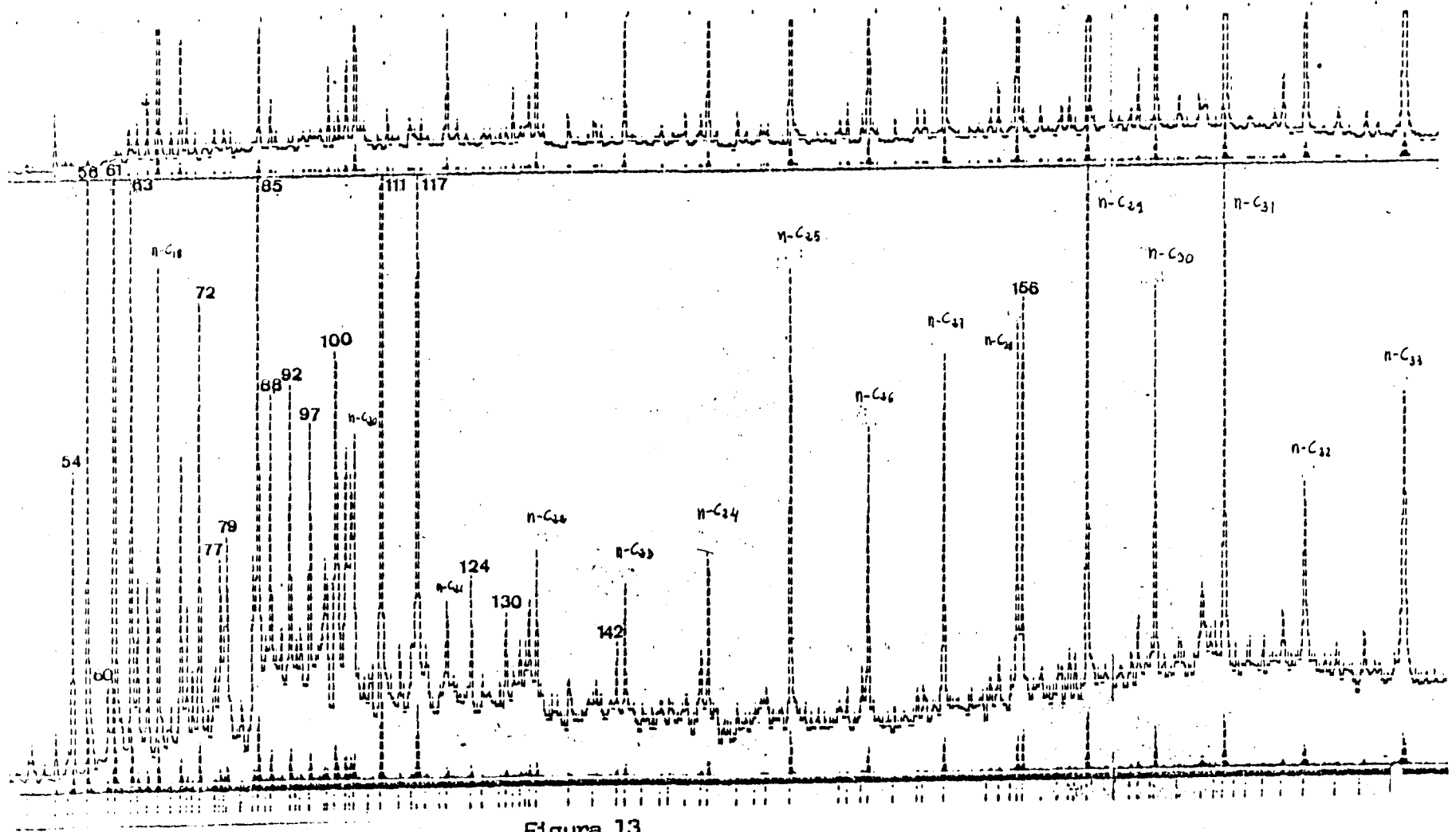


Figura 13

Cromatograma de ión total de la muestra SPI-2. Fracción de cloruro de metileno

TABLA F-1

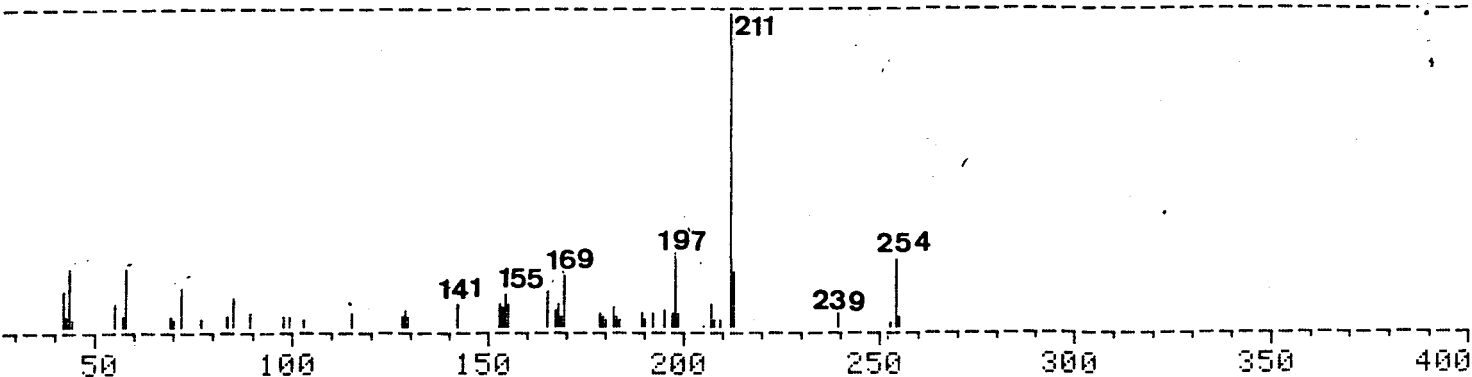
| pico nr. | compuesto | STIP | SIP | SIP-2 |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----|-------|
| 28 | fluoreno | - | 64 | - |
| 29 | eudaleno | - | 12 | - |
| 37 | fenilbenzaldehido | - | 10 | - |
| 38 | C5-naftaleno | - | 24 | - |
| 42 | cadaleno | - | 14 | - |
| 51 | fluorenona | - | 32 | - |
| 54 | dietilbifenilo | 5 | - | 63 |
| 55 | fenantreno | - | 10 | - |
| 56 | 2,2-dietilbifenilo | 14 | 30 | 139 |
| 60 | dietilbifenilo | - | - | 17 |
| 61 | 1,2-di(m-tolil)etano | 25 | 18 | 253 |
| 63 | di(m-tolil)etano | 14 | - | 117 |
| 70 | di(3,4-dimetilfenil)etano | 6 | - | - |
| 72 | o-terfenilo | 48 | 20 | 94 |
| 73 | 2-metilfenantreno | - | 20 | - |
| 77 | isómero del 70 | - | - | 30 |
| 78 | 9-metilfenantreno | - | 89 | - |
| 79 | etilfenil-tetrahydro- naftaleno | - | - | 34 |
| 85 | 1,2-di(3,4-dimetilfenil) etano | 46 | 14 | 224 |
| 88 | 13-metilpodocarpa-8,11,13- trieno | 42 | - | 68 |
| 90 | 2-hidroxixantona | 11 | - | - |
| 92 | 1,2-di(p-etilfenil)etano | 10 | - | 70 |
| 94 | isómero del 90 | 17 | - | - |
| 97 | 19-norabieta-8,11,13-trieno- (1,4a-dimetil,7-isopropil octahidro-1,2,3,4,4a,9,10, 10a-fenantreno) | 54 | 223 | 68 |
| 100 | dehidroabietina(isómero del 97) | 70 | 30 | 85 |
| 103 | pimantreno | - | 274 | - |
| 105 | dimetilfenantreno | - | 14 | - |
| 106? | 1,4a-dimetil,7-isopropil- hexahidro-1,2,3,4,4a,9,10, 10a-fenantreno | - | 20 | - |
| 108 | 9-isopropilfenantreno | - | 46 | - |
| 109 | alquiltetralina | 14 | - | - |
| 110 | isómero del 109 | 7 | - | - |
| 111 | 1-etilantracén-9,10-diona | 149 | 38 | 274 |
| 115 | norsimonelita(1,1-di-metil, 7-etiltetrahydro-1,2,3,4, fenantreno) | - | 10 | - |
| 116 | 9-metoxixantona | 13 | - | - |
| 117 | etilantracendiona | 130 | 20 | 198 |
| 118 | etil,metilfenantreno | - | 10 | - |
| 119? | isómero del 106 | - | 8 | - |
| 121 | 1-metil,7-etilfenantreno | - | 182 | - |
| 122 | trimetilfenantreno | - | 40 | - |
| 124 | 2,2-bis(4-clorofenil)-1,1- dicloroetileno | 13 | - | 27 |
| 126 | 1,3-dimetil,2-i 2-(4-iso- propilfenil)etilciclohexano carboxilato de metilo | 30 | 45 | - |

TABLA R-1(cont.)

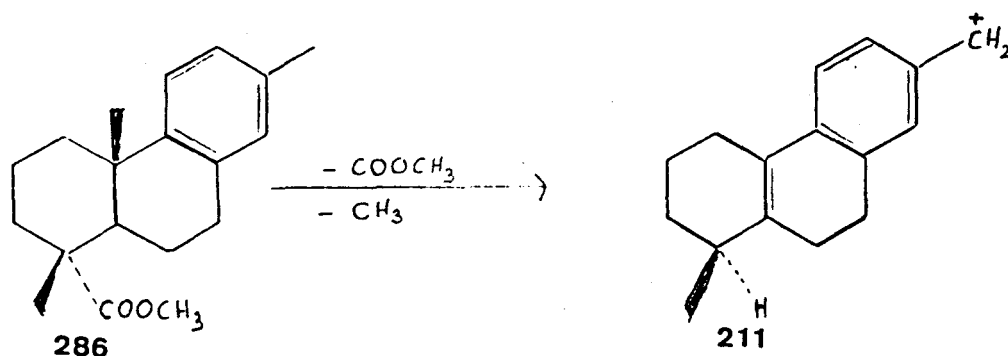
| pico nr. | compuesto | STIP | SIF | SIF-2 |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------|------|-----|-------|
| 128 | isómero del 126 | 10 | - | - |
| 130 | retenc | 8 | 456 | 22 |
| 133 | 1,7-dietilfenantreno | - | 58 | - |
| 134 | isómero del 130 | - | 32 | - |
| 135 | isómero del 130 | - | 21 | - |
| 138 | etil, isopropilfenantreno | - | 12 | - |
| 139 | homoretenc(1-etil,7-isopro- pilfenantreno) | - | 108 | - |
| 140 | 13-isopropil,5 α -podocarpa- 6,8,11,13-tetraen,16-carboxi- lato de metilo | - | 32 | - |
| 142 | dehidroabietato de metilo | 61 | 296 | 18 |
| 144 | metilretenc | - | 10 | - |
| 146 | isómero del 144 | - | 26 | - |
| 147 | isómero del 140 | - | 8 | - |
| 156 | triterpeno pentacíclico (C ₂₅ H ₄₂) | 23 | - | 82 |
| | difenilo | - | T | - |
| | 1,3-dimetilnaftaleno | - | T | - |
| | dibenzofurano | - | T | - |
| | benz(a)antraceno | - | T | - |
| | benzo(c)pireno | - | T | - |
| | benzo(a)pireno | - | T | - |
| | perileno | - | T | - |

estructura exacta.

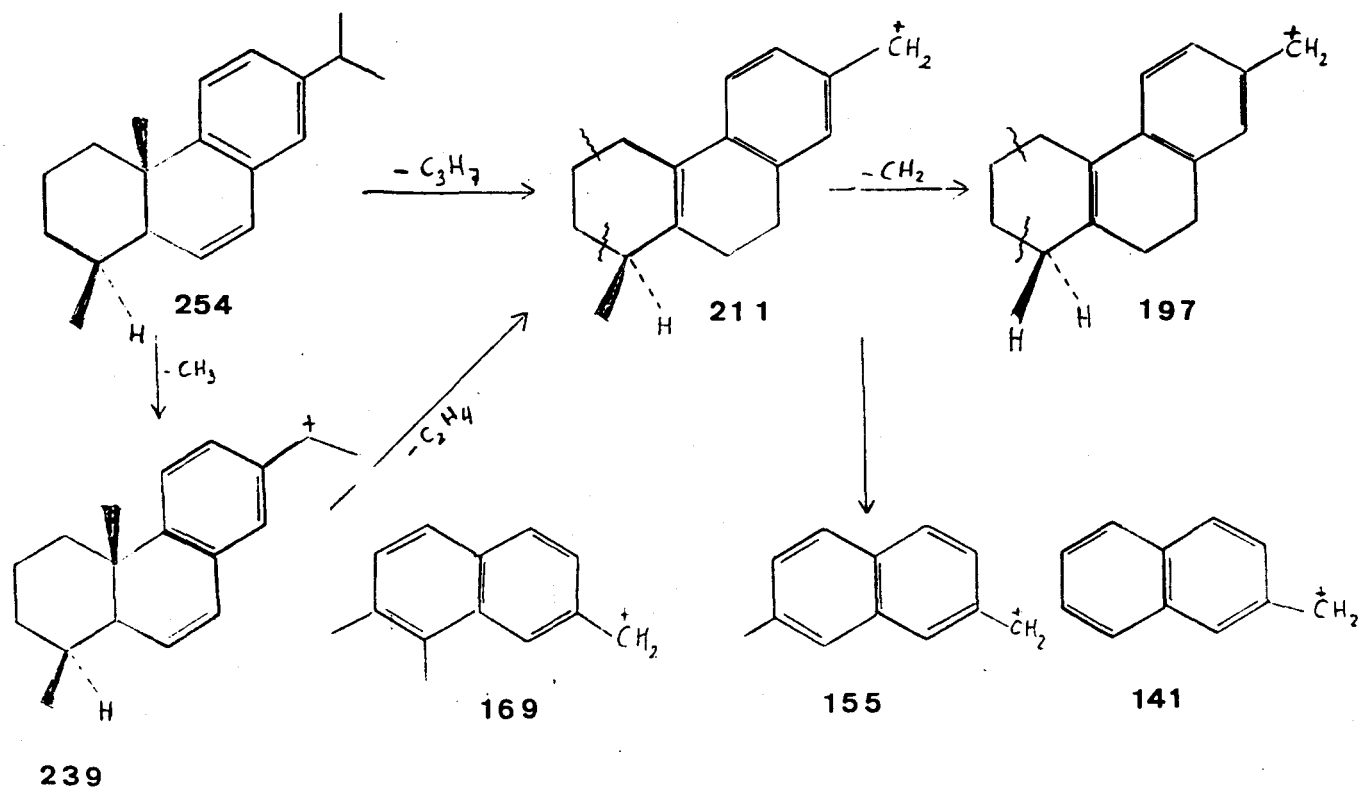
El compuesto número 106 presenta el espectro de masas siguiente :



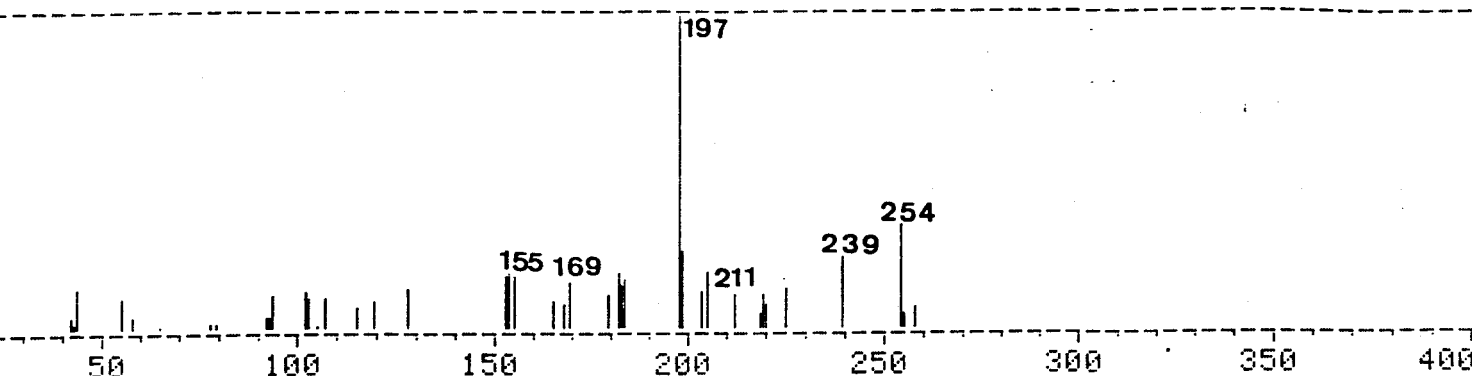
Admitiendo que el ión m/z 254 corresponde a la masa molecular, se trataría de un hidrocarburo de fórmula $C_{19}H_{26}$, y los iones a m/z 239, 211 y 197 significarían pérdidas de los fragmentos CH_3 , C_3H_7 y C_4H_9 respectivamente. Por otra parte, el ión 211 también constituye el fragmento principal en el compuesto 17-Bisnor-dehidroabietato metilo según el esquema siguiente (Simoneit y Mazurek, 1982) :



Igualmente , el ión m/z 197 ha sido identificado como fragmento característico de las estructuras de hexahidros fenantrenos con anillo terminal aromático (Simoneit y Mazurek , 1982) , siendo los iones m/z 169 , 155 y 141 correspondientes a la formación de compuestos naftalénicos sustituidos como consecuencia de la apertura parcial de los anillos fenantrénicos (Wozniak y Hites , 1985) . Todo ello hace suponer que el compuesto podría ser 1 , 4a - dimetil , 7 - isopropilhexahidro-1, 2 , 3 , 4 , 4a, 10a-fenantreno , con el que se puede establecer el mecanismo de fragmentación siguiente :

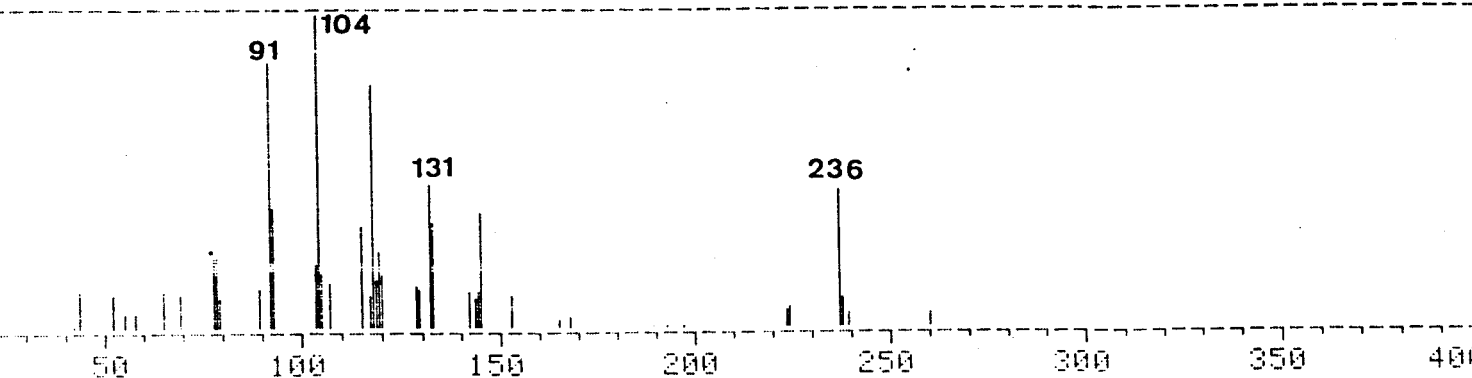


El compuesto número 119 presenta el fragmentograma siguiente :

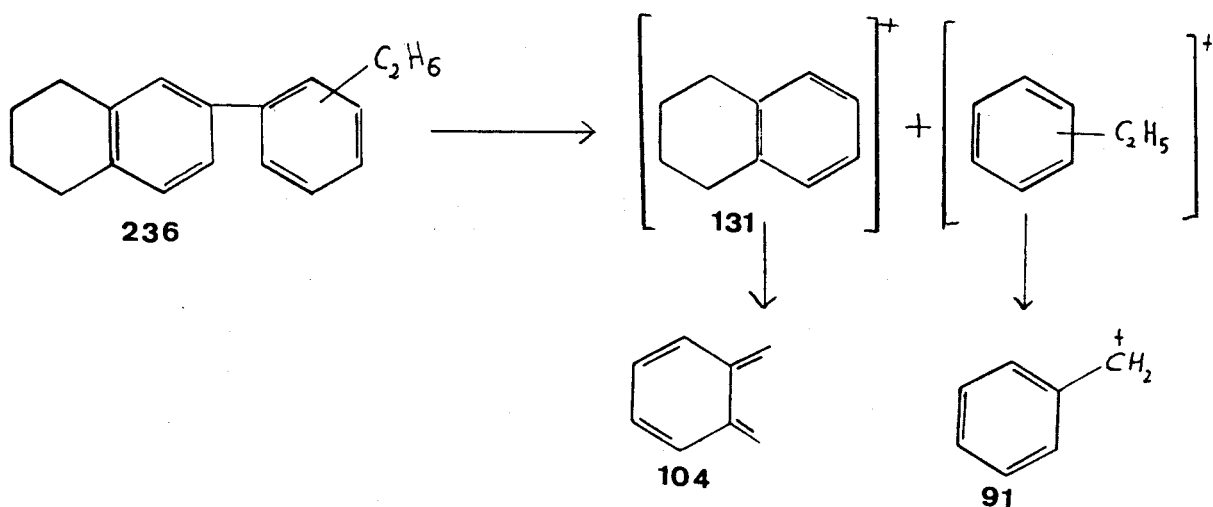


Su fragmentación es similar a la del compuesto 106 , diferenciándose especialmente en que el pico base es el ión a m/z 197 en vez del 211 . El ión m/z 254 también correspondería a la masa molecular del compuesto . La diferencia en el tiempo de retención está dentro de los márgenes ordinarios de compuestos isómeros , por lo que se puede suponer que se trata de un isómero del compuesto número 106 .

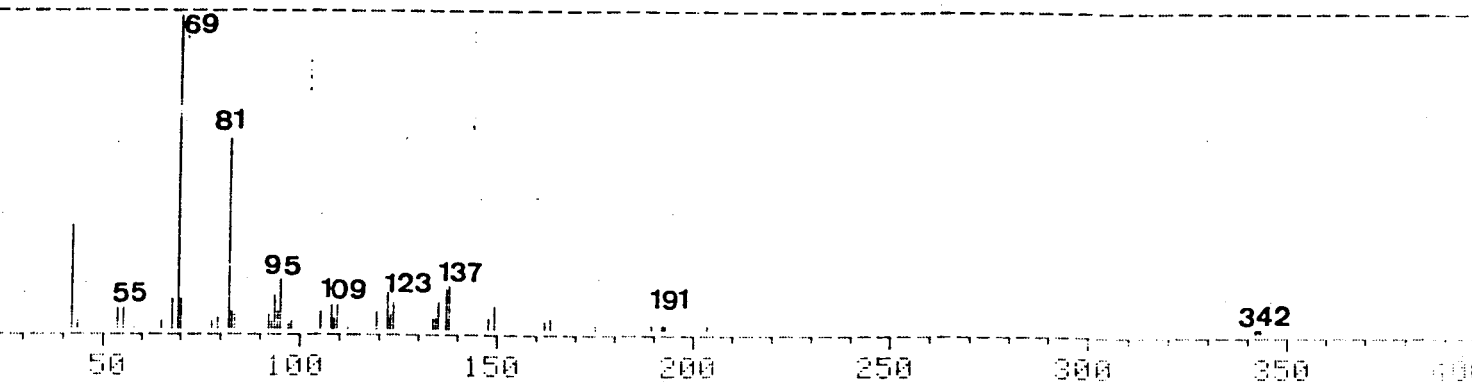
El compuesto número 79 presenta el espectro de masas siguiente :



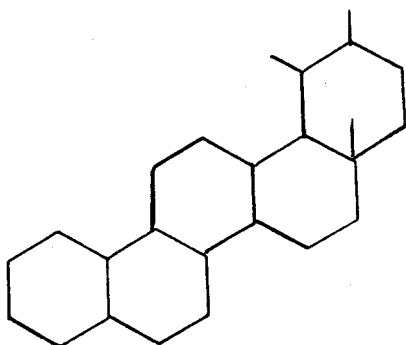
Su aparente masa molecular , m/z 236 , correspondería a un hidrocarburo de fórmula $C_{18}H_{20}$, con posible estructura de alquil-feniltetralina , compuestos aislados a partir de material lipídico de pizarras (Anders et al , 1973). El pico base a m/z 104 es idéntico al que presentan las tetralinas (Anders et al , 1975) . Por otra parte , los fragmentos m/z de menor intensidad 131 y 91 podrían derivar de la ruptura del enlace entre los núcleos fenilo y tetralínico del compuesto (Wozniak y Hites , 1985) . Estos datos justificarían la fragmentación siguiente :



El compuesto 156 tiene el siguiente espectro de masas :



Los iones mas importantes a m/z 69 , 55 , 81 , 95 , 109 123 y 137 son coincidentes con los de cicloalcanos pentacíclicos , siendo su molecular m/z 342 el correspondiente a un compuesto $C_{25}H_{42}$ que presenta dentro de la serie la característica particular de una disminución en la intensidad del ión m/z 191 (Anders y Robinson , 1971). De acuerdo con la asignación de estos autores se trataría del siguiente alcano pentaciclo de estructura tipo amirin con tres sustituyentes alquílicos :



De los resultados de la tabla R-1 , podemos destacar las siguientes observaciones :

1) En general , los compuestos mayoritarios detectados responden a las estructuras básicas de tipo naftaleno , fluoreno , fenantreno , bifenilo , antracendiona y amirin .

2) En el suelo del incendio de pinar (SIP) predominan los compuestos con estructura de fenantreno , aunque también se detectan eudáleno , cadaleno y fluoreno con carácter específico.

3) En el suelo del pinar incendiado después de dos años (SIP-2) se detectan con carácter predominante los compuestos bifenílicos , antraceniónicos y tipo amirin .

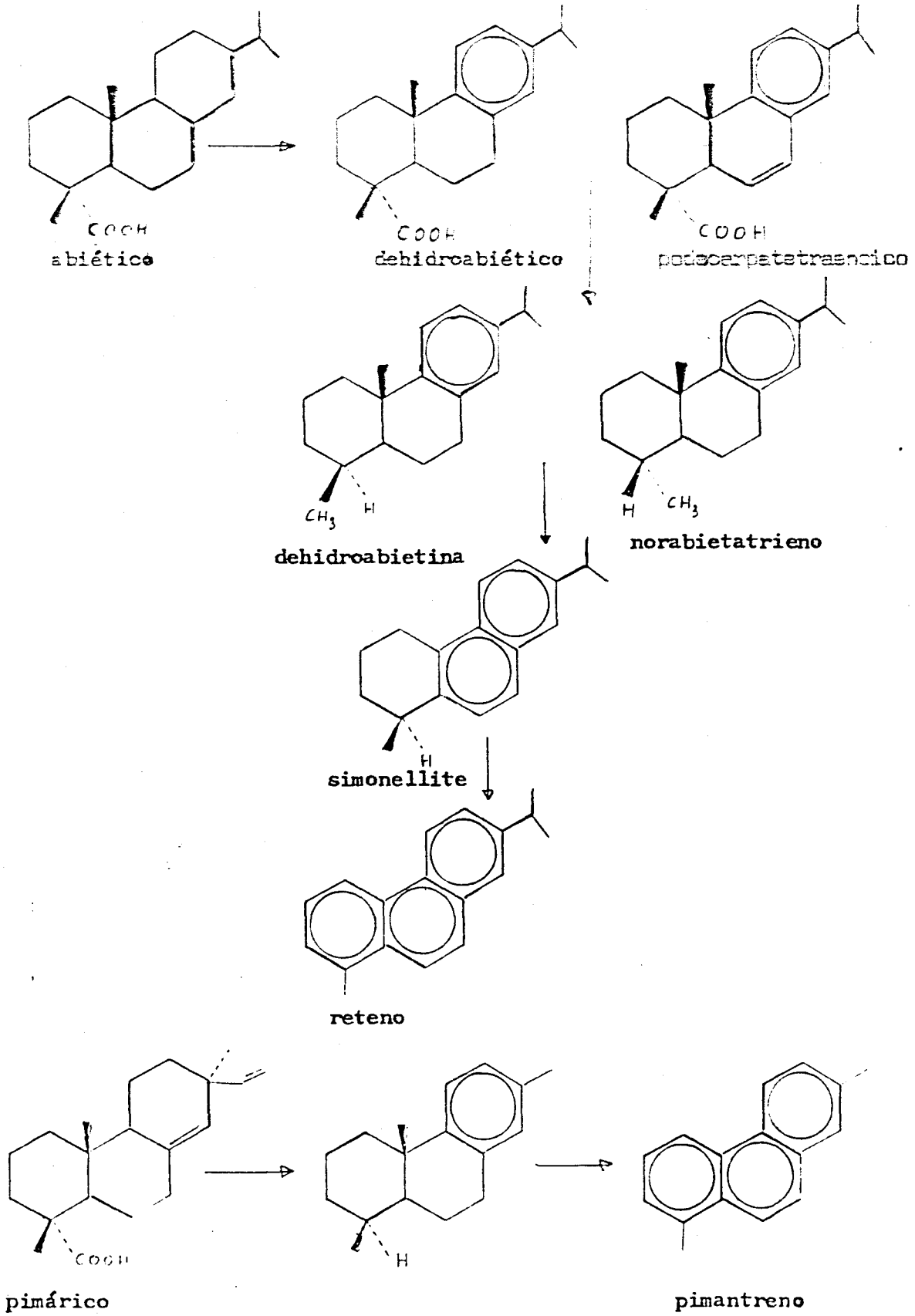
4) En el suelo testigo de pinar (STIP) se aíslan los mismos tipos de compuestos que en el suelo del incendio después de dos años pero en cantidades muy inferiores .

Analizaremos a continuación por separado el posible origen de los distintos tipos de C.F.A. identificados , agrupándolos por estructuras básicas.

A) Compuestos con estructura fenantrénica.

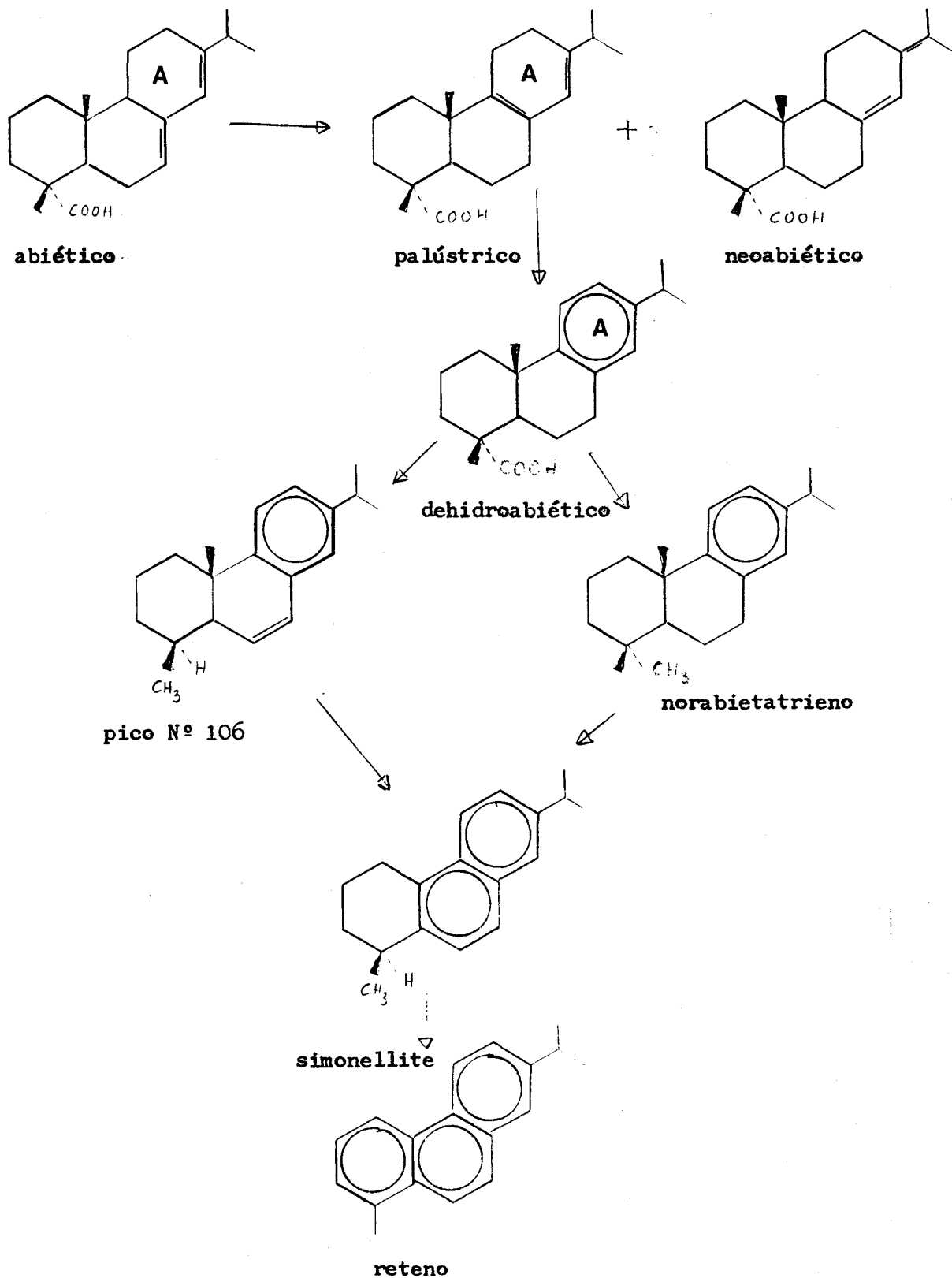
Los compuestos alquílicos e hidroaromáticos del fenantreno son típicos de la degradación de los ácidos resínicos , de acuerdo con el esquema R-1 propuesto para , los ácidos abiético y pimárico (Laflamme y Hites , 1978; Wakeham et al , 1980 ; Simoneit y Mazurek , 1982) . Sin embargo , la detección original de algunos compuestos y la referencia a una posible degradación térmica permite sugerir algunos aspectos inéditos y complementarios al esquema degradativo propuesto :

1) La génesis térmica a partir de ácido abiético con formación predominante de abietatrieno y reteno se podría justificar admitiendo que dicho ácido se isomeriza térmicamente en los ácidos palústrico y neoabiético , tal como se ha reproducido en experiencias de laboratorio (Takeda et al , 1968) , ya que este proceso explicaría tanto la aromatización preferencial por el anillo terminal "A" como la detección de los compuestos números 106 y 119, tal como se recoge en el esquema R-2 .



ESQUEMA R-1

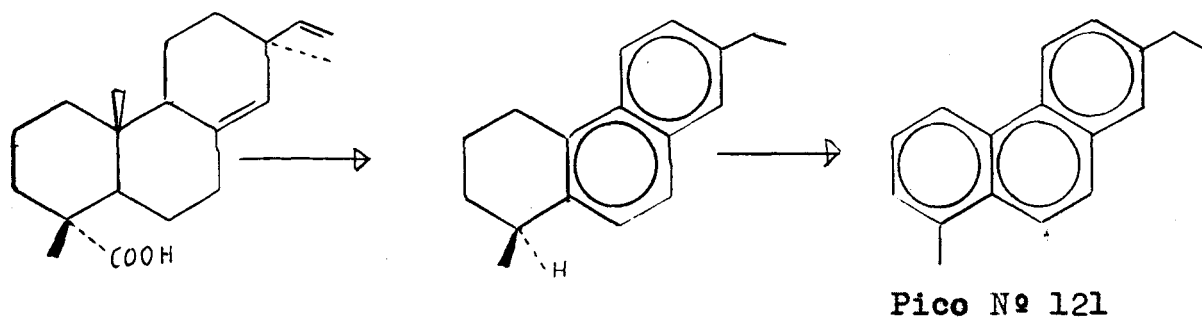
100



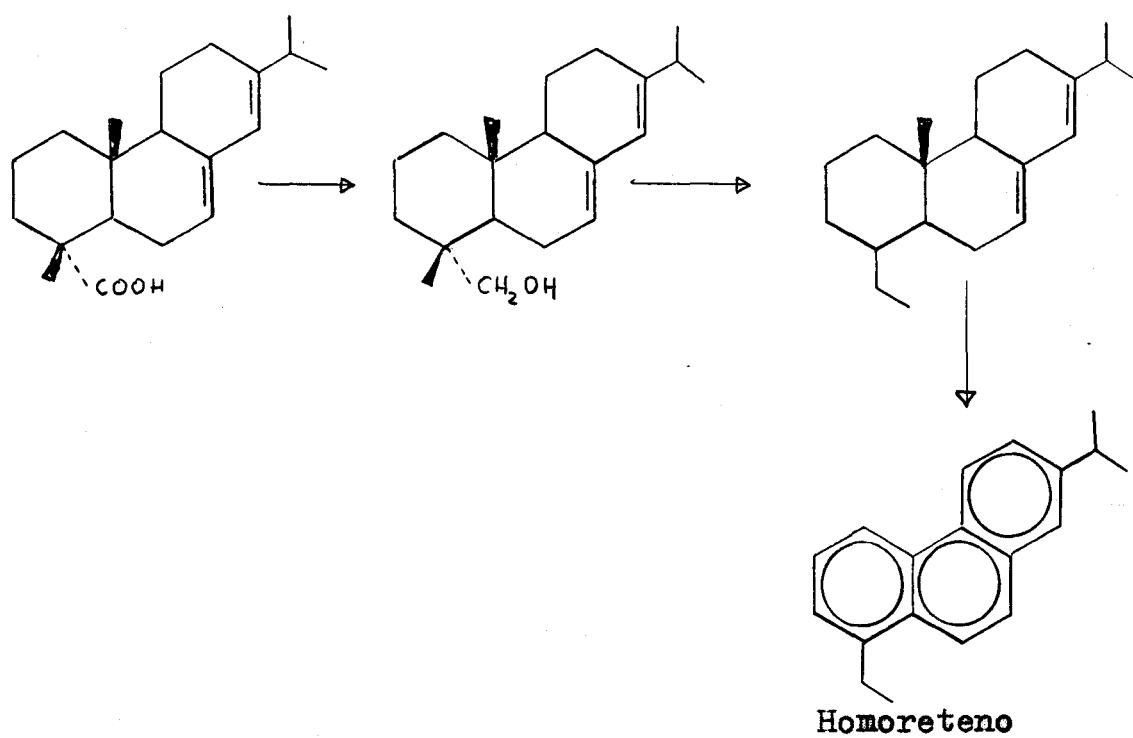
2) La degradación propuesta para el ácido pimárico produce pimantreno, y así se detecta en la muestra SIP (pico número 103) con carácter de compuesto mayoritario. Sin embargo, la presencia de Norsimonellite (pico número 115) y 7-etil,1-metilfenantreno (pico 121) sugieren que la génesis térmica permite la permanencia del radical etilo en posición "7" como consecuencia de la conjugación de los dobles enlaces entre el anillo y el y el radical alifático, tal como se expresa en el esquema R-3.

3) La presencia de homoreteno en las muestras podría explicarse por la vía propuesta en el esquema R-4. La detección de reteno adherido a partículas de carbón en los aerosoles de incendios forestales (Simoneit y Mazurek, 1982) implicaría la existencia de zonas de ambiente reductor en los incendios y por tanto no se deben excluir fenómenos de reducción química en el proceso térmico genérico. Según esta hipótesis se podría admitir la reducción del grupo ácido a alcohol que por transposición de Wagner y Meerwein originaría en la deshidratación un grupo etilo en posición "1", tal como se ha reproducido en la síntesis de laboratorio de homoreteno (Fieser y Fieser, 1955).

4) La presencia de fenantreno y distintos derivados mono, di, tri y tetrametilados parece sugerir que ocurren algunos fenómenos complementarios a los anteriormente citados. Así, el fenantreno puede generarse en la desalquilación de pimantreno y/o reteno, el 9-metilfenantreno por metilación selectiva de fenantreno o



ESQUEMA R-3



ESQUEMA R-4

el 2-metilfenantreno por isomerización térmica de 1-metilfenantreno tal como ha sido propuesto en otros trabajos (Radke et al , 1982) . Igualmente , los diversos isómeros tri y tetrametilados confirmarían la posibilidad de estas reacciones de desálquilación y/o isomerización. Las concentraciones de estos compuestos son bastantes mas pequeñas que las de sus posibles precursores , por lo que podemos considerarlos , de acuerdo con la hipótesis de su génesis , procesos secundarios de la transformación térmica de los ácidos resínicos.

La distribución cuantitativa de esta serie de componentes en las distintas muestras (ver tabla R-1) , puede interpretarse mejor comparando concentraciones de los compuestos terminales de la degradación térmica : pimantreno , 1-metil,7-etilfenantreno ,reteno y homoreteno . Así, se observa que dichas cantidades está relacionada con la composición cuantitativa (abiético: pimárico , 4: 1) de los ácidos resínicos en la biomasa de pino (Genge , 1969) , y por eso tienen mayor importancia los compuestos derivados del ácido abiético. Si se comparan las cantidades de reteno , el compuesto mas abundante de la serie , en las muestras SIP y SIP-2 se observa que hay una desaparición casi completa de dicho compuesto , acentuándose dicho fenómeno en los restantes componentes de la serie hasta el punto que sólo se detectan en SIP-2 pimantreno y homoreteno al forzar las condiciones cromatográficas. Este hecho puede atribuirse a la solubilidad de estos compuestos en agua , y en consecuencia

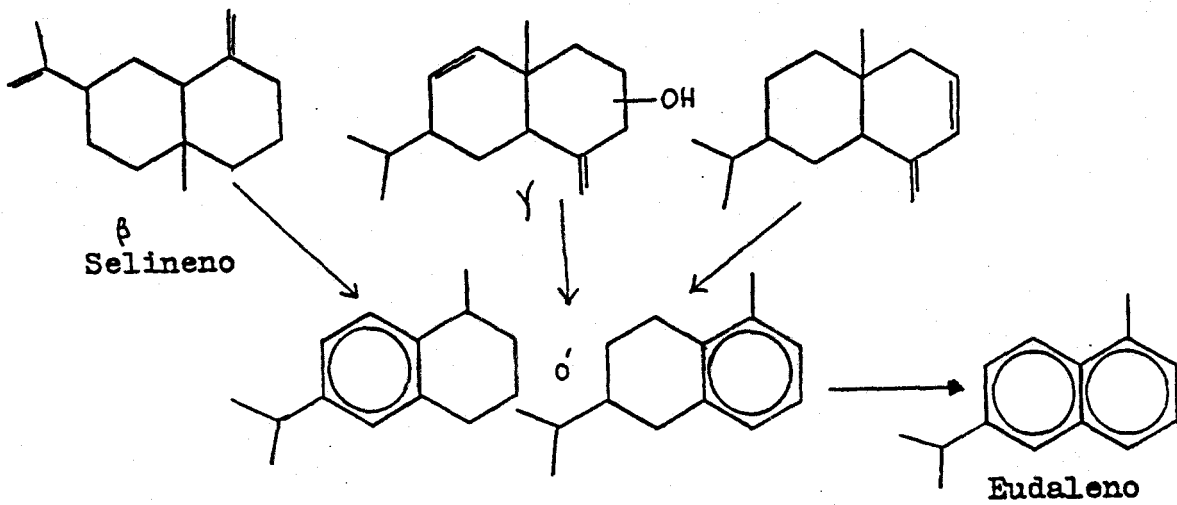
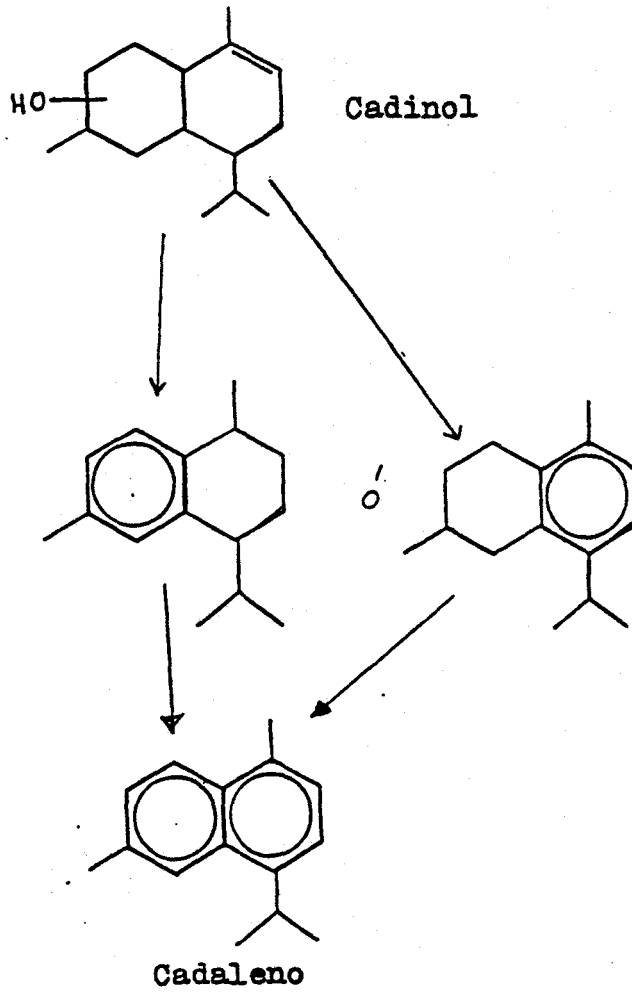
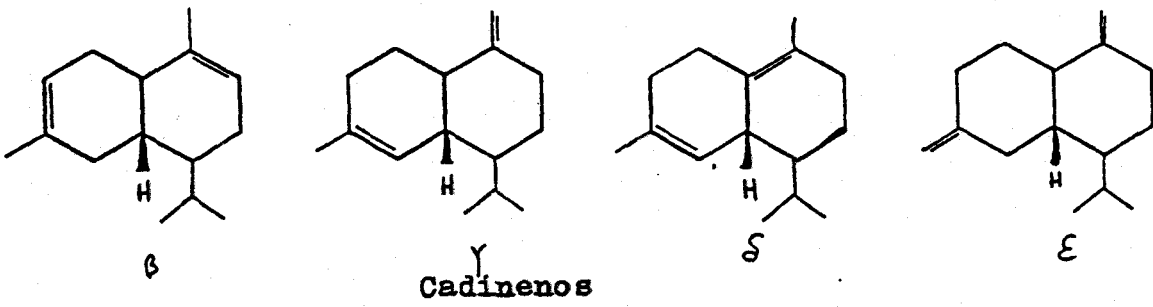
a su posible lavado hacia horizontes de más profundidad del suelo .

Si se comparan las cantidades de reteno en las muestras SIP y STIP , se observa un notable incremento en la primera de ellas , que demuestra que el incendio es la vía predominante del enriquecimiento del suelo en esta serie de componentes .

Si se comparan las concentraciones de norabietatrieno y dehidroabietina (picos números 97 y 100) , se observa que en la muestra SIP es mucho mayor la concentración del primero , prácticamente idénticas las cantidades de ambos en la muestra SPI-2 y mayor la de dehidroabietina en STIP . De estos datos es especialmente interesante el hecho de que sólo en uno de los isómeros de los posibles compuestos intermedios , se enriquezcan tanto el suelo tras el incendio (Norabietatrieno) como el suelo testigo (Dehidroabietina) , lo que parece indicar que existen diferencias entre la evolución de los ácidos resínicos por vía térmica y ordinaria .

B. Compuestos naftalénicos.

Los compuestos de estructura naftalénica provienen de la transformación térmica de los sesquiterpenos vegetales según el esquema R- 5 (Haagen-Smit , 1962 ; Simoneit y Mazurek , 1982) . Sin embargo , la tendencia de los compuestos mas volátiles a acumularse preferencialmente en la fase gaseosa de los humos (Atlas et al , 1985) , hace que previsiblemente estas sustancias se detecten en los suelos de los incendios en concentraciones mas bajas que las



Esquema R-5

correspondientes a los aerosoles de los mismos , y por ello se detectan eudaleno y cadaleno en la muestra SIP en cantidades relativamente bajas .

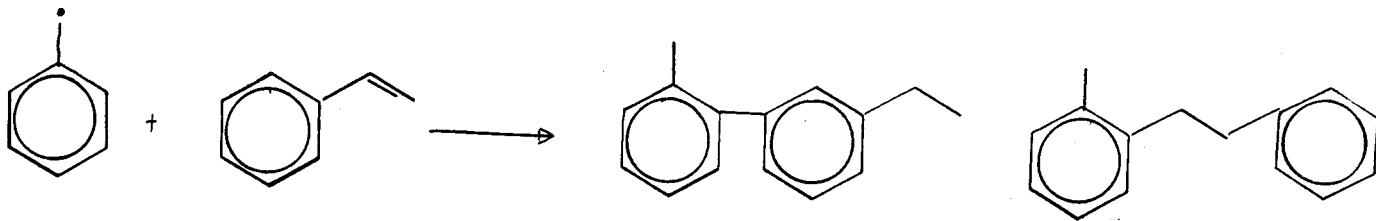
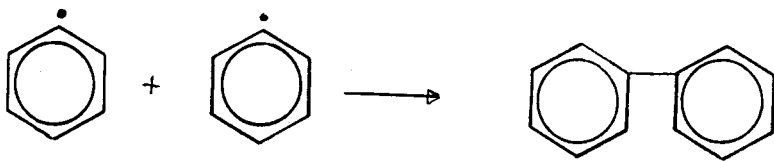
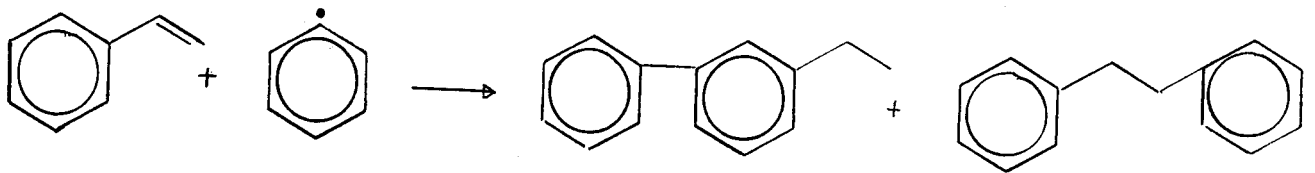
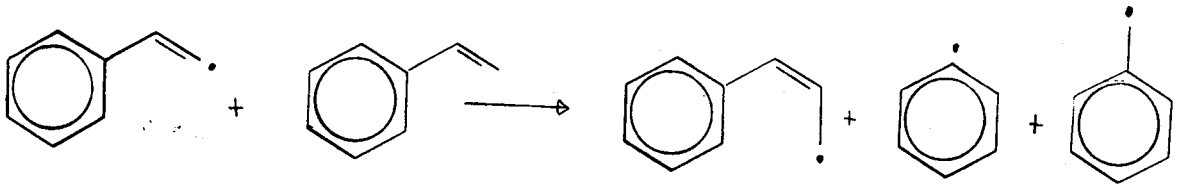
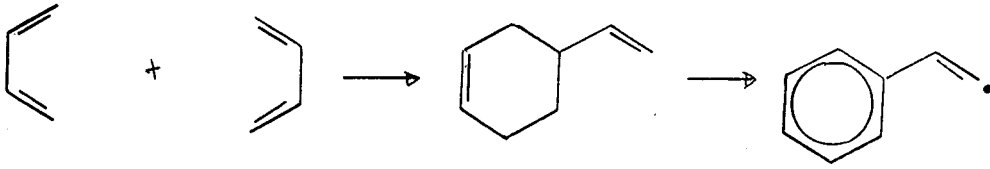
La ausencia de estos compuestos en la muestra SPI-2 es consecuencia de la especial solubilidad en agua de los derivados alquílicos de naftaleno , por lo que se incrementa su lavado hacia horizontes mas profundos del suelo y/o el arrastre por las aguas superficiales. .

La inexistencia de los compuestos naftalénicos en el suelo testigo del incendio de pinar parece indicar que estos compuestos se generan exclusivamente por via tèrmica , pudiéndose descartar para los sesquiterpenos una evolución en el suelo análoga a la que se ha observado en la serie de los ácidos resínicos.

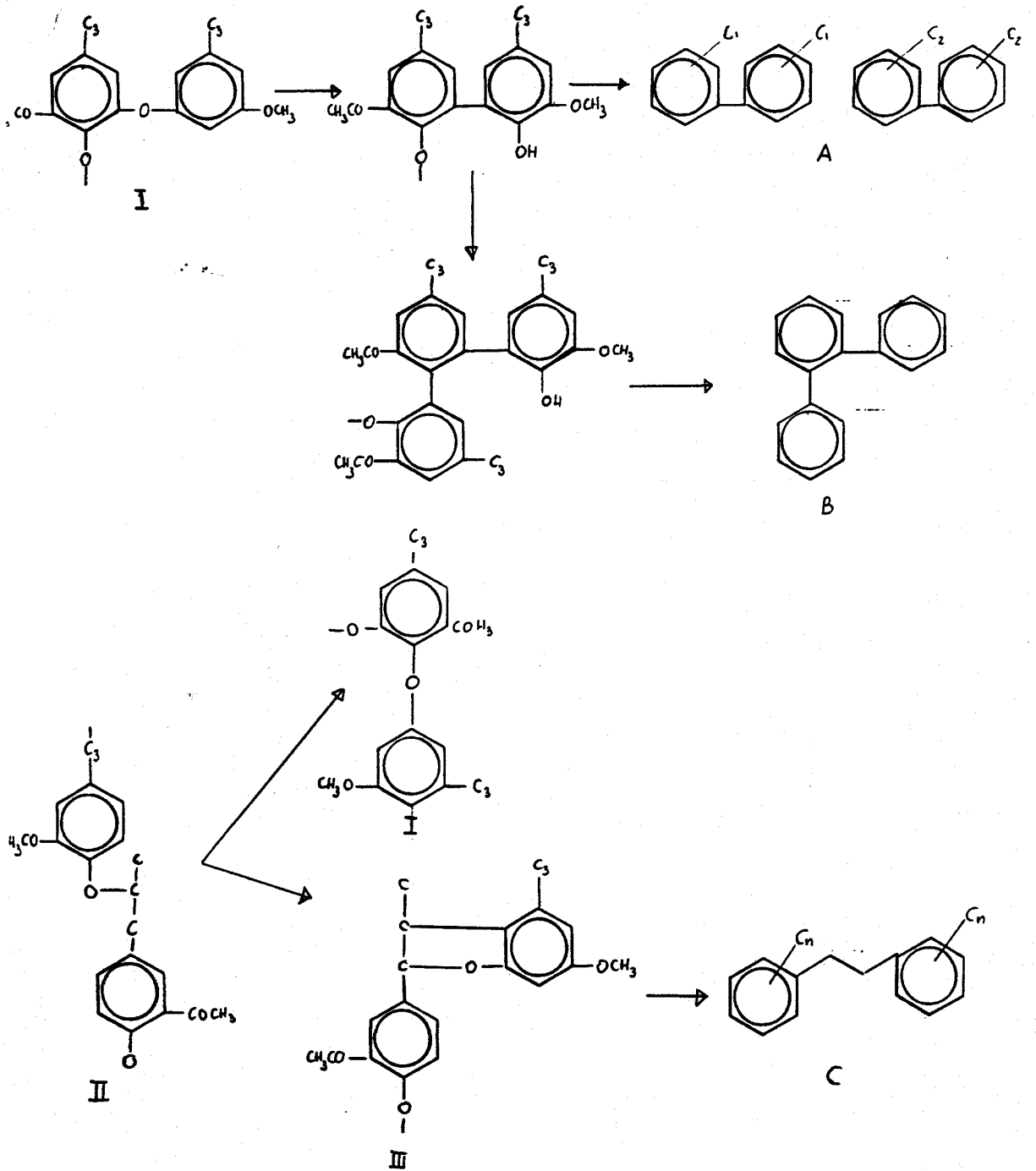
C) Compuestos bifenílicos.

Los compuestos bifenílicos se han detectado en diversas muestras de combustión de biomasa y carbones minerales (Lee y Novotny , 1976 ; Browitzky y Schomburg , 1979 ; White , 1983) , habiéndose atribuido su origen tanto a fenómenos de pirólisis de alcanos , tal como se expresa en el esquema R-6 (Blumer , 1976 ; Jacobs y Billings , 1985) , como a degradaciones tèrmicas de lignina según el esquema R-7 (Attar , 1982).

El estudio de las fracciones eluidas con n-hexano de las muestras dió el contenido en alcanos siguiente :



ESQUEMA R-6



ESQUEMA R-7

| Alcano | STIP | SPI | SPI-2 |
|--------|------|-----|-------|
| n-C-21 | 14 | 54 | 31 |
| n-C-22 | 24 | 47 | 39 |
| n-C-23 | 12 | 43 | 36 |
| n-C-24 | 8 | 56 | 43 |
| n-C-25 | 45 | 107 | 83 |
| n-C-26 | 11 | 81 | 75 |
| n-C-27 | 34 | 124 | 105 |
| n-C-28 | 15 | 67 | 52 |
| n-C-29 | 110 | 208 | 160 |
| n-C-30 | 12 | 96 | 84 |
| n-C-31 | 67 | 184 | 133 |

De esta distribución podemos realizar las observaciones siguientes:

1) En las tres muestras existe un claro predominio de los alcanos superiores de número de carbono impar (C-25 C-27 , C-29 y C- 31) característico de la biomasa de pino (Herbin y Robins , 1968) , con un enriquecimiento de dichos compuestos en el caso del suelo del incendio , lo que sugiere que éste se enriquece en sustancias que no han sufrido transformaciones importantes con respecto al estado químico en el que se encuentran en los restos vegetales inalterados .

2) No hay indicios claros de pirólisis de alcanos ya que no se detectan los compuestos n-C-21 , n-C-22 y n-C-23 con carácter predominante como corresponde a dicho fenómeno (Kissin et al , 1986) .

Estas dos observaciones permiten que se pueda descartar

la transformación térmica de alcanos como posible origen de los compuestos bifenílicos y se deba atribuir, por tanto, a transformaciones del biopolímero lignina.

Si se analizan las cantidades de los compuestos de esta serie (números 54 , 56 , 60 , 61 , 63 , 70 , 72 , 77 y 85) se observa que son especialmente abundantes en la muestra del suelo del incendio después de dos años (SPI-2) , lo que parece indicar que su acumulación no es consecuencia directa de la combustión sino mas bien de la evolución en el suelo de los restos vegetales parcialmente quemados . Sin embargo , este hecho no implica que no se de pirólisis de lignina sino que su alteración térmica es muy heterogénea, y los diversos grados de destrucción del biopolímero explicarían la detección tanto de las sustancias mas simples correspondientes a su pirólisis , cresoles , xilenoles , trimetilfenoles , vanillina , bifenilo , metilbifenilos y benzofurano (Martín et al , 1979) , como otros núcleos estructurales mas complejos provenientes de la biodegradación en el suelo de unidades lignínicas parcialmente alteradas en el incendio .Esta hipótesis está fundamentada en los hechos siguientes :

1) Los compuestos simples característicos de la pirólisis de lignina tienen puntos de ebullición bastantes mas bajos que los compuestos bifenílicos , y para determinarlos hay que cromatografiar las fracciones eluidas con cloruro de metileno de 50 a 270 C a 5 C/min , y así evitar que se eliminen en el efecto disolvente del modo Splitless de inyección . En nuestro caso , sólo se

detectaron dichas sustancias en la muestra del suelo del incendio e indicios de algunos de ellos en la correspondiente al incendio despues de dos años tal como se muestra en la figura 14 .Estos datos indican que se ha producido piròlisis completa de lignina y las disminuciones observadas en el transcurso de los dos años (SPI-2) se pueden atribuir al lavado ya que los compuestos fenòlicos son comparativamente mas solubles en agua que los derivados bifenilicos.

2) La detecciòn de bifenilo y dibenzofurano , forzando las condiciones de inyecciòn , en la muestra del suelo del incendio asi como la presencia de cantidades relativamente bajas de los derivados alquilicos de bifenilo (compuestos 56 , 61 , 63 y 85) indica que dichas estructuras se pueden originar de forma directa en la piròlisis de la lignina durante la combustiòn. Igualmente, la detecciòn de los derivados alquilicos de bifenilo en la muestra testigo del incendio puede servir de comprobaciòn de la biodegradaciòn de lignina , tal como se ha propuesto al aislarse dichos compuestos en fracciones hùmicas del suelo (Ortiz de Serra y Schitzer , 1973) .

3) El incremento de los compuestos de esta serie en la muestra SPI-2 es consecuencia de la biodegradaciòn de restos ligninicos parcialmente alterados durante la combustiòn y que , por su estructura compleja ,no se aislan mediante extracciòn con disolventes. Sin embargo , si se han aislado en las fracciones hùmicas mencionadas porque su extracciòn conlleva ataques quimicos destructivos .

Nº1.p-cresol

Nº4.xilenol

Nº7.trimetil-fenol

Nº2.o-cresol

Nº5.2,5-xilenol

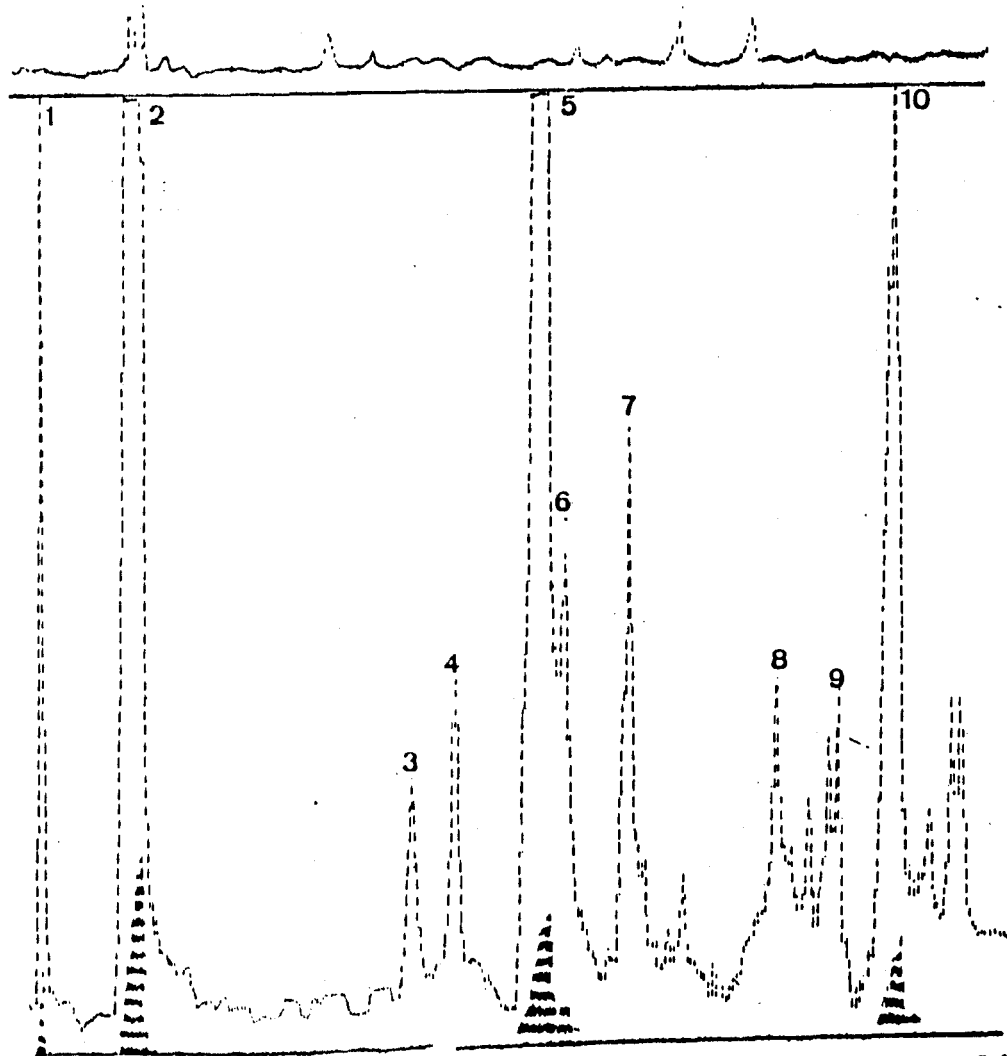
Nº8.trimetil-fenol

Nº3.xilenol

Nº6.xilenol

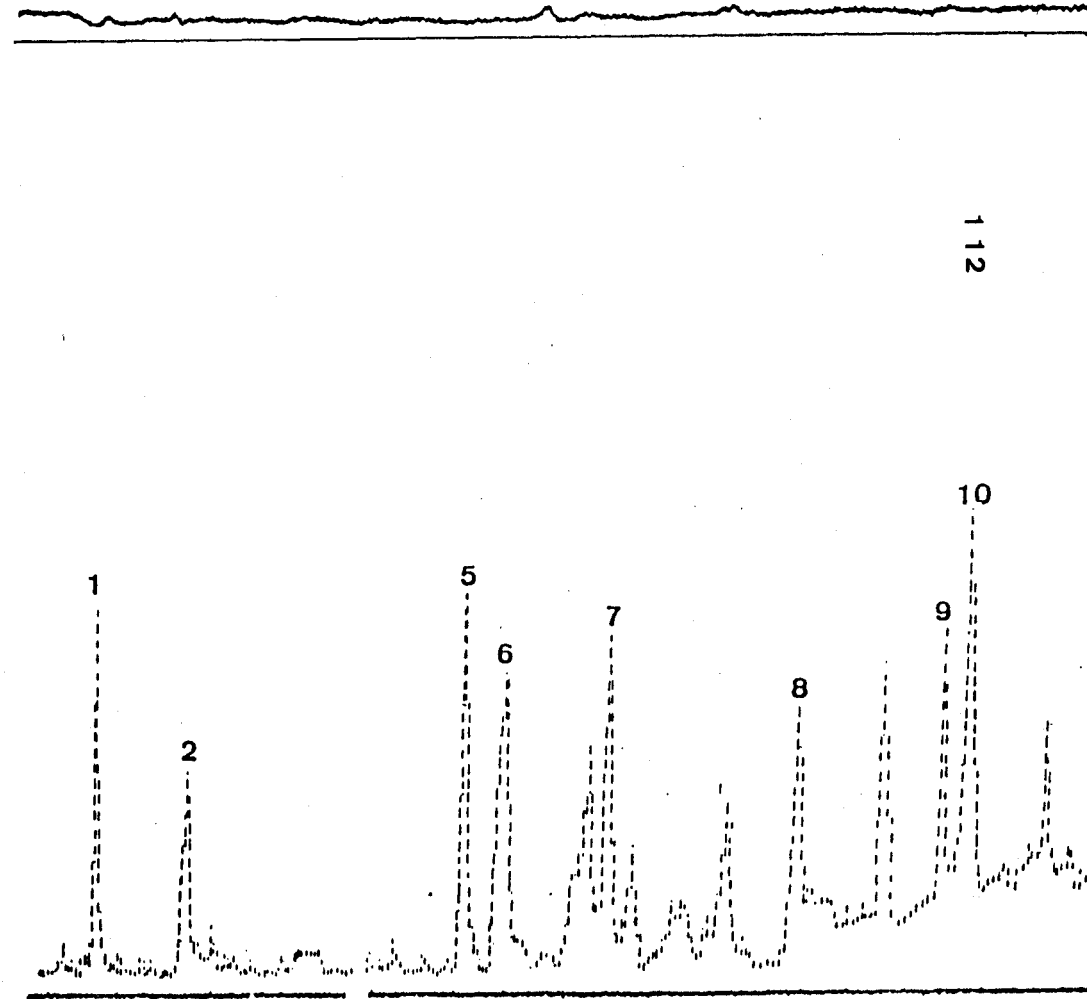
Nº9.trimetil-fenol

Nº10.vanillina



Muestra SPI

Figura 14



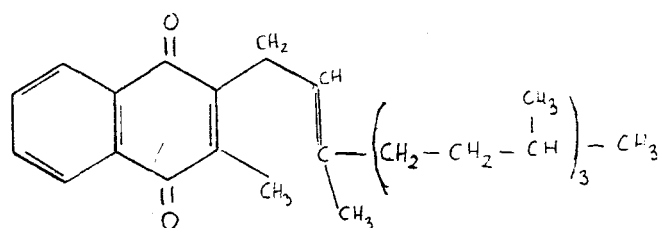
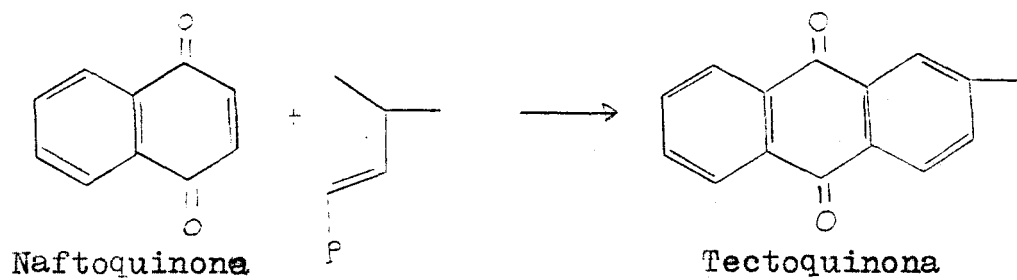
Muestra SPI-2

D. Compuestos antracendiònicos.

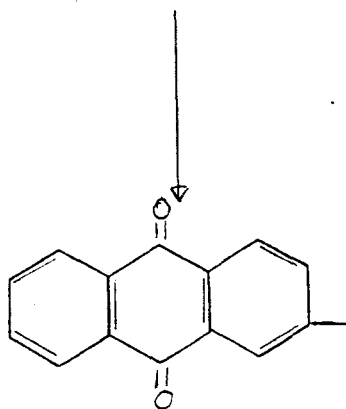
La estructura de antracendiona es frecuente en los pigmentos de las plantas superiores, siendo emodina (7-metil-1,6,8-trihidroxiantracen-9,10-diona) el compuesto más difundido en el reino vegetal (Thomson, 1965). También se han aislado compuestos de este tipo en muestras geológicas (Winan et al, 1979) pero con la característica estructural de ser derivados alquílicos sustituidos exclusivamente en uno de los anillos bencènicos, y por ello se atribuye su origen bien a metabolizaciones por hongos de compuestos procedentes de la oxidación de lignina que a través de la ruta del γ,γ -dimetilalilpirofosfato produce compuestos del tipo tectoquinona o a biodegradación de la vitamina K-1 que también da el tipo estructural de tectoquinona, tal como se recoge en el esquema R-8 (Thomson, 1965).

Si comparamos las cantidades de los compuestos detectados de esta serie (números 111 y 117) observaremos que son más abundantes en las muestras SPI-2 y STIP que en la correspondiente al suelo del incendio lo que indica que no se originan en el proceso de combustión. Por otra parte sus estructuras son de tipo tectoquinona por lo que probablemente este tipo de compuestos se han originado por biodegradación bien de componentes resultantes en la oxidación de restos lignínicos tales como naftol y naftoquinona (Hyrata et al, 1979) o de la vitamina K-1 característica de las plantas verdes.

De acuerdo con esto, las mayores concentraciones en la



Vitamina K-1



ESQUEMA R-8

muestra SPI-2 se deberian al aumento de los restos oxidados de lignina y consiguiente incremento de los fenómenos de biodegradación .

E. Hidrocarburo pentacíclico (número 156)

Los triterpenos pentacíclicos de tipo amirina son parte del componente graso de las plantas superiores , y el aislamiento de una serie de compuestos con este tipo de estructura en materia orgánica sedimentaria ha permitido establecer la hipótesis de que derivan de la fotodescomposición de terpenoides y posterior aromatización diagenética de los mismos (Wakeham et al , 1980) .

El compuesto detectado (número 156) en las muestras STP y SPI-2 tiene una estructura de alcano pentacíclico por lo que , admitiendo la hipótesis de Wakeham , se trataría de una sustancia derivada de terpenoides que no ha llegado a la etapa de aromatización , y por eso no presenta núcleos aromáticos. La distribución de este compuesto en las muestras parece responder a fenómenos similares a los observados en los compuestos antracendiónicos .

F. Compuestos con estructura de fluoreno

El fluoreno y la fluorenona (números 28 y 51) se han detectado específicamente en el suelo del incendio . Aunque el fluoreno se puede generar por calentamiento de 2-metilbifenilo , tal como se hace en la síntesis de laboratorio , la vía comúnmente propuesta en la literatura es que tanto fluoreno , fluorenona y sus derivados alquílicos se producen en la oxidación y descarboxilación

de compuestos alquílicos de fenantreno (Yu y Hites ,1981).

La abundancia de pimantreno y reteno en el suelo incendiado donde aún persisten condiciones de oxidación justificarian la formación de fluoreno y fluorenona por esta vía. Por tanto , estos productos no son consecuencia directa de la secuencia degradativa del ácido abiético , sino que son productos generados en procesos secundarios y que aparecerán en las muestras de incendios en función de las condiciones de combustión.

G. Compuestos no cuantificados .

Los compuestos detectados forzando las condiciones de inyección reflejados al final de la tabla(benz(a)antraceno , criseno , benzo(c)pireno , benzo(a)pireno y perileno) son productos característicos de la pirólisis de alcanos que ya hemos mencionado .

Sus concentraciones bajísimas , que por extrapolación de los límites de detección podemos cifrar en 1 ng/gr , reflejan que los fenómenos de transformación térmica de alcanos están minimizados en el proceso de combustión de este incendio , tal como ya se ha puesto de manifiesto .

El conjunto de todos estos datos permite afirmar que en el incendio del pinar se produce fundamentalmente un enriquecimiento del suelo en alcanos y compuestos de la serie degradativa de los ácidos resínicos , del orden de 50 y 200 gr por hectárea respectivamente (tomando como base del cálculo la profundidad del muestreo y la densidad media de los suelos) , siendo mínimo el aporte de posibles compuestos cancerígenos, del orden de 0.5 gr por hectárea,

por lo que se puede considerar la hipotética acción cancerígena de la combustión de biomasa de estas características como muy inferior al uso de los combustibles fósiles, en donde si se dan aportes significativos de compuestos oncogénicos y/o mutagénicos (Bjorseth y Eklund , 1979 ; Choudhury y Bush , 1981 ; Wakeham et al , 1982) .

IV.3.2. Incendio controlado de rastrojera de cereal .

En la figuras 15 y 16 se muestran los cromatogramas de ión total de las fracciones de cloruro de metileno de las muestras de suelo testigo (STIR) y suelo de incendio controlado de rastrojera de cereal (SIR), recogiéndose la naturaleza y cuantificación de sus componentes individuales en la tabla R-2 .

Los compuestos números 114 , 149 , 150 , 152 , 154 y 155 se identificaron por comparación de sus tiempos de retención y espectros de masas con sustancias modelos . Hay que hacer notar que la pareja de n-alcenos que delimitan a los compuestos 114 , n-C- 20 y n-C-21 , 149 y 150 , n-C-23 y n-C-24 , 152 , n-C-26 y n-C-27 , y 154 , n-C-27 y n-C-28 , son coincidentes con las publicadas , con independencia de que se usen otras condiciones cromatográficas , y no interfieren en la identificación de dichos C.P.A. (Wauters et al , 1979) .

Los compuestos números 87 , 125 y 125# coinciden en

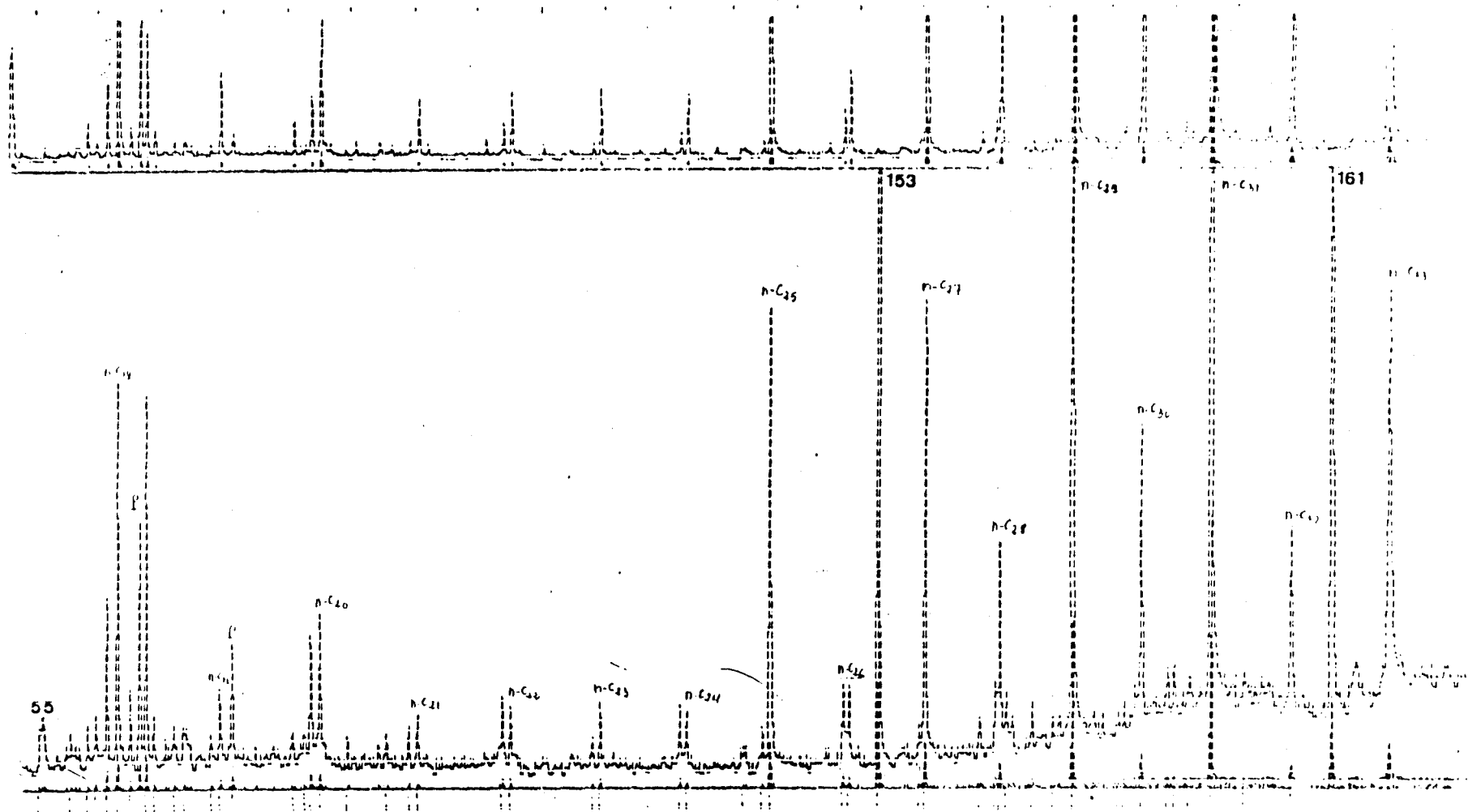


Figura 15

Cromatograma de ión total de la muestra STIR. Fracción de cloruro de metileno

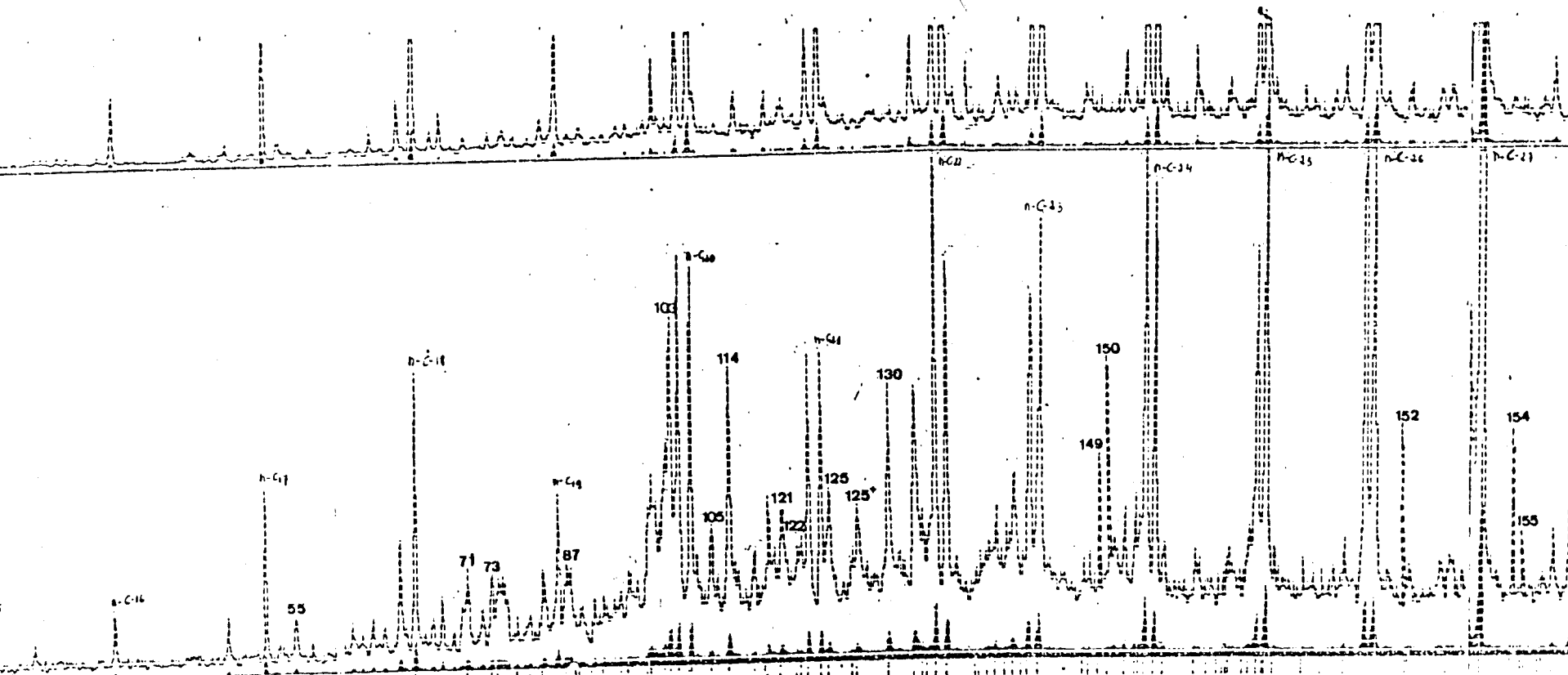


Figura 16

Cromatograma de ión total de la muestra SIR, Fracción de cloruro de metileno

pico

| nr. | compuesto | STIR | SIR |
|--------------------------|------------------------------|------|-----|
| 13 | 2,6-di-tertbutilbenzoquinona | - | 6 |
| 20 | 2,6-di-tertbutil-p-cresol | - | 4 |
| 55 | fenantreno | 4 | 4 |
| 71 | 3-metilfenantreno | - | 8 |
| 73 | 2-metilfenantreno | - | 7 |
| 87 | dihidropireno | - | 6 |
| 103 | pimantreno | - | 22 |
| 105 | dimetilfenantreno | - | 8 |
| 114 | pireno | - | 19 |
| 121 | 1-metil,7-etilfenantreno | - | 4 |
| 122 | C3-fenantreno | - | 2 |
| 125 | metilpireno | - | 8 |
| 125#isómero del anterior | | - | 6 |
| 130 | reteno | - | 19 |
| 149 | benz(a)antraceno | - | 10 |
| 150 | criseno | - | 20 |
| 152 | benzo(k)fluoranteno | - | 14 |
| 153 | no identificado | 184 | - |
| 154 | benzo(e)pireno | - | 18 |
| 155 | benzo(a)pireno | - | 4 |
| 161 | no identificado | 138 | - |

índices de retención y espectros de masas con los publicados . Así, el compuesto 87 pudo identificarse como dihidropireno , que tiene el mismo tiempo de retención y masa molecular que el 2-fenilnaftaleno , por la intensidad de los iones M-1 y M-2 (Yu e Hites , 1981).

Los compuestos 153 y 161 no se lograron identificar .

De los resultados de la tabla R-2 se pueden destacar los aspectos generales siguientes :

1) La muestra del suelo del incendio de rastrojera de cereal (SIR) tiene un contenido global de C.P.A. comparativamente mucho mas bajo que el suelo del incendio de pinar (SIP), y ello se puede atribuir a la menor cantidad de masa vegetal combustionada .

2) Los compuestos identificados en SIR responden a las estructuras fenantrénicas , pirénicas y C.P.A. de mas de cuatro ciclos .

El menor contenido global e individual de los compuestos derivados de los ácidos resínicos se puede atribuir al pobre contenido en dichos ácidos de la rastrojera de cereal (Guenther et al , 1975).

La hipótesis comúnmente aceptada para la formación de C.P.A de cuatro o mas ciclos es la pirólisis de alcanos (Blumer y Youngblood , 1975).

En la muestra del suelo del incendio de rastrojera de cereal son especialmente abundantes los n-alcanos superiores , y por eso eluyen conjuntamente con los C.P.A. en la fracción de cloruro de metileno en concentraciones mayores que en las demás muestras .

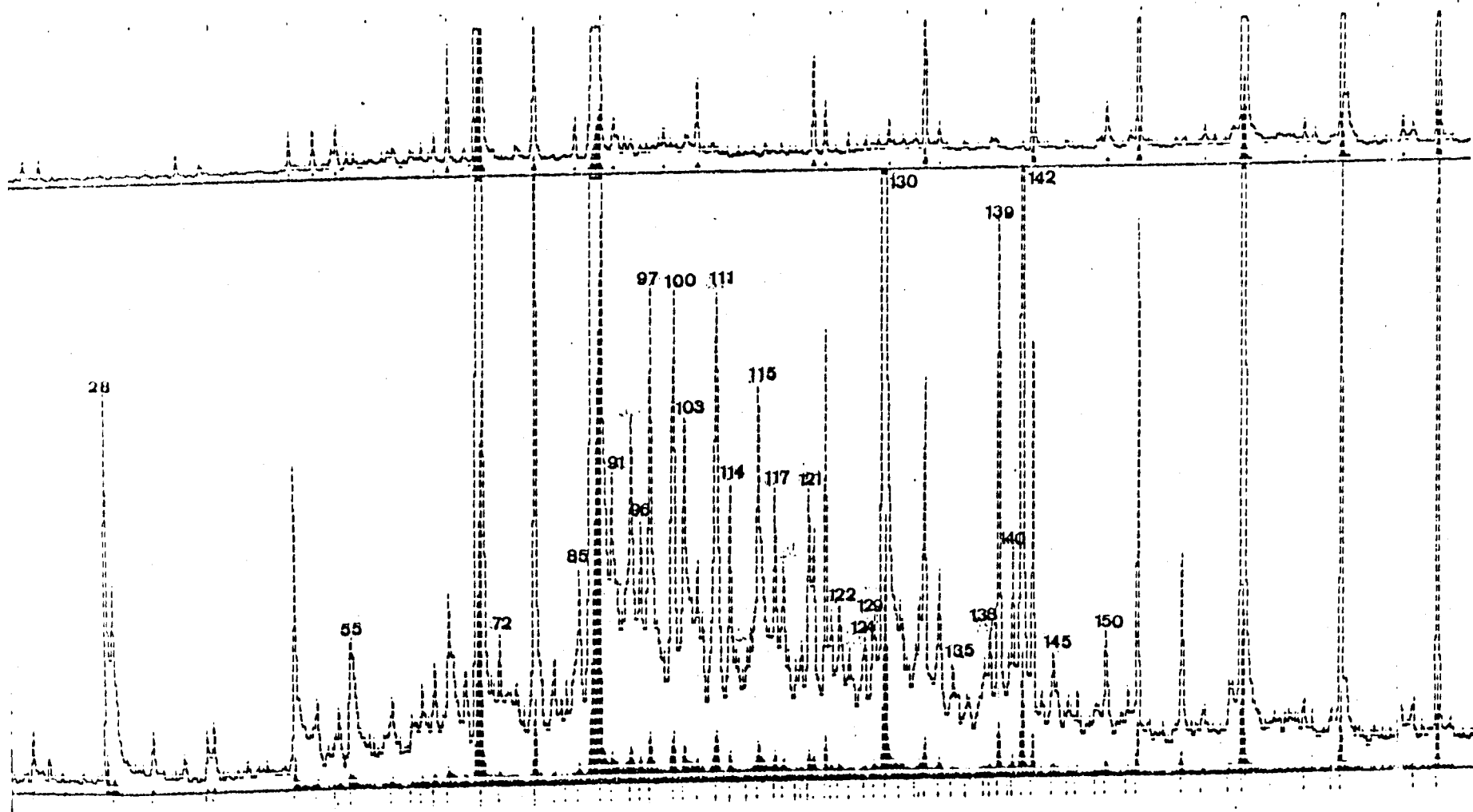
El análisis de la fracción eluida con n-hexano y el cromatograma de la figura 16 muestran que hay un incremento de los n-alcenos n-C-21 , n-C-22 y n-C-23 característico de la pirólisis de los alcanos superiores (Kissin et al , 1986) . Igualmente , la detección de dihidropireno , que es un producto intermedio en la formación de pireno a partir de la pirólisis de n-alcenos , parece confirmar que la presencia de los C.P.A de mas de tres ciclos es debida al mencionado fenómeno pirolítico, favorecida por la abundancia de n-alcenos y la mayor temperatura de combustión asociada a las mejores condiciones de aireación provocada por la combustión de biomasa en un solo plano .

Esta hipótesis , justifica el incremento de los C.P.A. de mas de cuatro ciclos de la muestra del suelo del incendio de la rastrojera con respecto al incendio del pinar .

No obstante , las cantidades detectadas de estos C.P.A. siguen siendo muy inferiores a las producidas con el uso de los combustibles fósiles , por lo que tampoco se puede considerar que sea muy importante el efecto polutante de estos incendios .

IV.3.3. Hogueras de biomasa de pino y olivo .

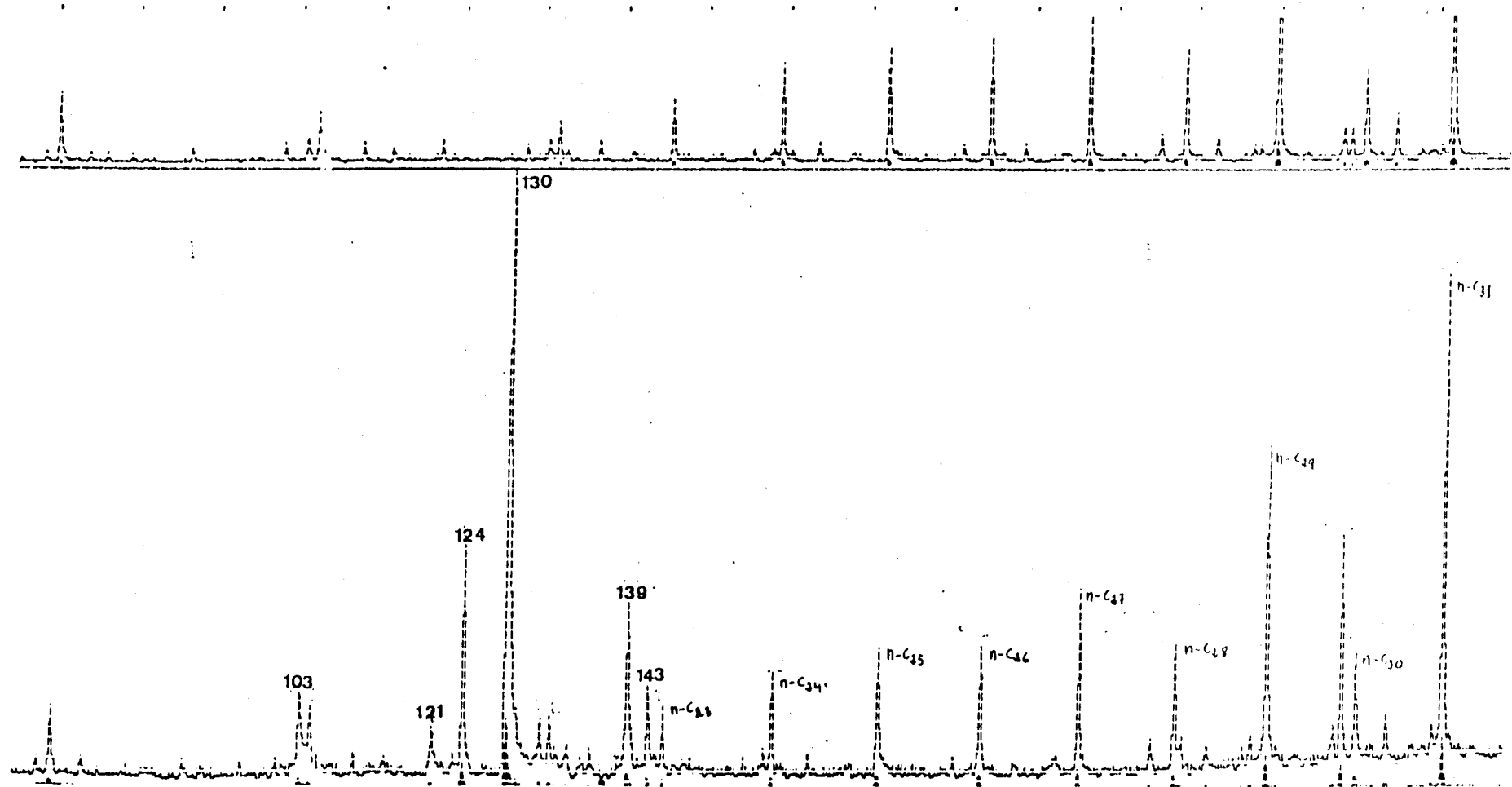
En las figuras 17 , 18 y 19 se presentan los cromatogramas de ión total de las muestras de suelos de hoguera de pino (SHP), de hoguera de pino de hace 100 años y de restos de cascada de leña procedente de la poda de olivo (CIS) , siendo la naturaleza y cuantificación de



123

Figura 17

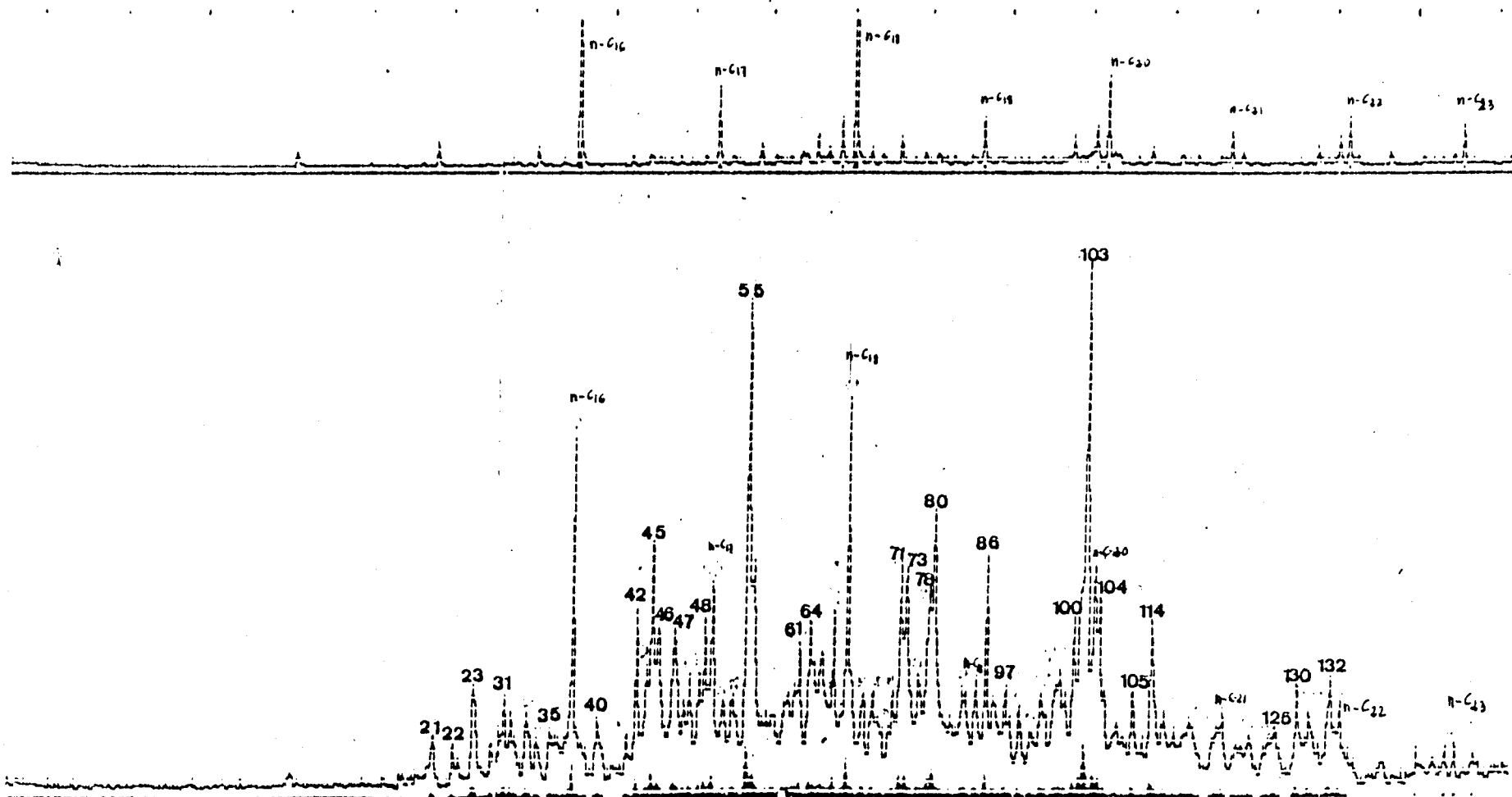
Cromatograma de ión total de la muestra SHP. Fracción de cloruro de metileno



124

Figura 18

Cromatograma de ión total de la muestra SHP-100. Fracción de cloruro de metileno



125

Figura 19
 Cromatograma de ión total de la muestra CIS. Fracción de cloruro de metileno

TABLA R-3

| pico nr. | compuesto | SHP | SHP-100 | CIS |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------|-----|
| 21 | C3-naftaleno | - | - | 10 |
| 22 | C3-naftaleno | - | - | 8 |
| 23 | C3-naftaleno | - | - | 16 |
| 28 | fluoreno | 112 | - | - |
| 31 | 2,2-dimetilbifenilo | - | - | 14 |
| 35 | xanteno | - | - | 8 |
| 40 | C5-naftaleno | - | - | 10 |
| 42 | cadaleno | - | - | 30 |
| 45 | metilfluoreno | - | - | 64 |
| 46 | metilfluoreno | - | - | 18 |
| 47 | o-fenil anisol | - | - | 28 |
| 48 | C5-naftaleno | - | - | 24 |
| 55 | fenantreno | 48 | - | 124 |
| 61 | 1,2-di(m-tolil)etano | - | - | 12 |
| 64 | C2-fluoreno | - | - | 20 |
| 71 | 3-metilfenantreno | - | - | 42 |
| 72 | o-terfenilo | 26 | - | - |
| 73 | 2-metilfenantreno | - | - | 20 |
| 78 | 9-metilfenantreno | - | - | 44 |
| 80 | 1-metilfenantreno | - | - | 56 |
| 85 | 1,2-di(3,4-dimetilfenil)etano | 52 | - | - |
| 86 | 1-(3,5-dimetoxifenil)-1- hidroxi-3-metilbutano | - | - | 38 |
| 91 | 1,1-di(p-etilfenil)etano | 32 | - | - |
| 96 | norabieta-4,8,11,13-tetraeno (1,4a-dimetil-7-isopropil-hexa hidro-2,3,4,4a,9,10-fenantreno) | 36 | - | - |
| 97 | norabietatrieno | 112 | - | - |
| 100 | dehidroabietina | 104 | - | - |
| 103 | pimantreno | 96 | 8 | 136 |
| 104 | fluoranteno | - | - | 32 |
| 105 | dimetilfenantreno | - | - | 12 |
| 111 | 1-etilantracen-9,10-diona | 108 | - | - |
| 114 | pireno | 72 | - | 38 |
| 115 | norsimonellita | 86 | - | - |
| 117 | etilantracendiona | 56 | - | - |
| 119 | isómero del 106 (tabla R-1) | 28 | - | - |
| 120 | isómero del 127 | 30 | - | - |
| 121 | 1-metil,7-etilfenantreno | 54 | 6 | - |
| 122 | C3-fenantreno | 16 | - | - |
| 124 | 2,2-bis(4-clorofenil)- 1,1-dicloroetileno | 10 | 26 | - |
| 127 | simonellita | 19 | - | - |
| 130 | reteno | 548 | 118 | 16 |
| 132 | metilpireno | - | - | 16 |
| 135 | isómero del 130 | 12 | - | - |
| 138 | isómero del 130 | 18 | - | - |
| 139 | homoreteno | 184 | 20 | - |
| 140 | isopropilpodocarpa tetra- noato de metilo | 54 | - | - |
| 142 | dehidroabietato de metilo | 248 | - | - |
| 143 | 2-(2-clorofenil)-2-(4-cloro- fenil)-1-tricloroeteno | - | 8 | - |
| 145 | 2,4,6-tri-t-butilfenol | 16 | - | - |
| 150 | criseno | 24 | - | - |

los C.P.A. individuales los recogidos en la tabla R-3 .

El compuesto número 104 se identificò por comparación de su tiempo de retención y espectro de masa con los de la correspondiente sustancia modelo.

Como se observa en la tabla R-3 existen diferencias cualitativas y cuantitativas entre los C.P.A. aislados en estas muestras . Del primer tipo , podemos destacar las siguientes :

1) Los compuestos naftalènicos solo se detectan en el suelo de hoguera de restos de poda de olivo .

2) Los compuestos bifénlicos aislados en el suelo de hoguera de pino tienen estructuras análogas a los identificados el suelo de incendio de pinar , detectándose otro distinto en la muestra CIS (o-fenilanol , pico 47).

3) Se aislan compuestos de mas de tres ciclos , correspondiendo pireno y criseno a SHP y pireno y fluoranteno a la muestra del suelo de la hoguera de restos de poda de olivo .

4) El fluoreno se detecta en la muestra del suelo de hoguera de pino mientras que en la muestra CIS se identifican los derivados metilados de fluoreno .

Las principales diferencias son , sin embargo , de tipo cuantitativo . En particular destacan , como era de esperar, las diferencias entre la hoguera reciente y la realizada hace 100 años , que presenta un pobre perfil de C.P.A. . Sin embargo , aún se detectan los compuestos básicos de la degradación tèrmica de los ácidos resínicos lo que prueba la persistencia in situ de dichos compuestos a pesar

del lavado intenso a que han sido sometidos estos suelos , cultivados en régimen de regadío.

Comparando las cantidades globales de los compuestos fenantrénicos se observa que decrecen en el orden SHP > CIS , de acuerdo con el hecho , anteriormente discutido , de que la cantidad global de los compuestos de esta serie generados por combustión depende del contenido en ácidos resínicos de las distintas especies vegetales (pino > olivo) . Sin embargo , si se comparan las cantidades de componentes individuales de esta serie se observa el ordenamiento siguiente :

Pimantreno CIS > HP

Reteno HP > CIS

Estos datos parecen confirmar que la proporción de abi tico y pimárico en las distintas especies vegetales condicionan las cantidades relativas de pimantreno y reteno generadas en la degradación t rmica de dichos ácidos, tal como se ha puesto de manifiesto en el caso del suelo del incendio de pinar .

Las cantidades relativamente altas de fenantreno , fluoreno y metilfluoreno de las muestras SHP y CIS sugieren que son importantes los fenómenos secundarios de desalquilación y oxidación y/o descarboxilación de los compuestos de la serie de los ácidos resínicos reseñados en el suelo del incendio de pinar . Este hecho puede atribuirse a que en las hogueras se mejoran las condiciones de aireación como consecuencia del carácter puntual de la combustión , provocándose tanto la elevación de la

temperatura de la misma como el incremento de la oxidación de los derivados alquílicos del fenantreno .

Los compuestos bifenílicos tienen concentraciones relativamente bajas , y ello parece confirmar la hipótesis expuesta anteriormente de originarse en la degradación térmica de lignina. La presencia de o-fenilanol (n°47) y de dimetoxifenilhidroximetilbutano (n°86) en la muestra CIS responde a las ligeras variaciones de los grupos estructurales del mencionado biopolimero en las distintas especies vegetales (Martín et al , 1979) .

Los derivados alquílicos de naftaleno detectados en la muestra CIS tienen estructuras de compuestos generados en la degradación térmica de sesquiterpenos vegetales , y su abundancia relativa en dicha muestra es consecuencia de que el olivo contiene mayores cantidades de sesquiterpenos que el pino (Guenther et al , 1975) .

La presencia de C.P.A. de mas de tres ciclos se podría atribuir a la pirólisis de alcanos . Sin embargo , el perfil de n-alcanos de las fracciones eluidas con n-hexano indica que dichos procesos estan minimizados por lo que esta posible fuente no debe ser considerada en el caso de las hogueras y deben existir otras vías alternativas . Así, para fluoranteno y pireno se puede considerar la posibilidad de ser metabolitos inalterados durante la combustión ya que dichos compuestos se han detectado en la biomasa de distintas especies vegetales y muy especialmente en el olivo (Mogante , 1974). Igualmente , criseno es un producto aislado en la degradación de triterpenos pentacíclicos

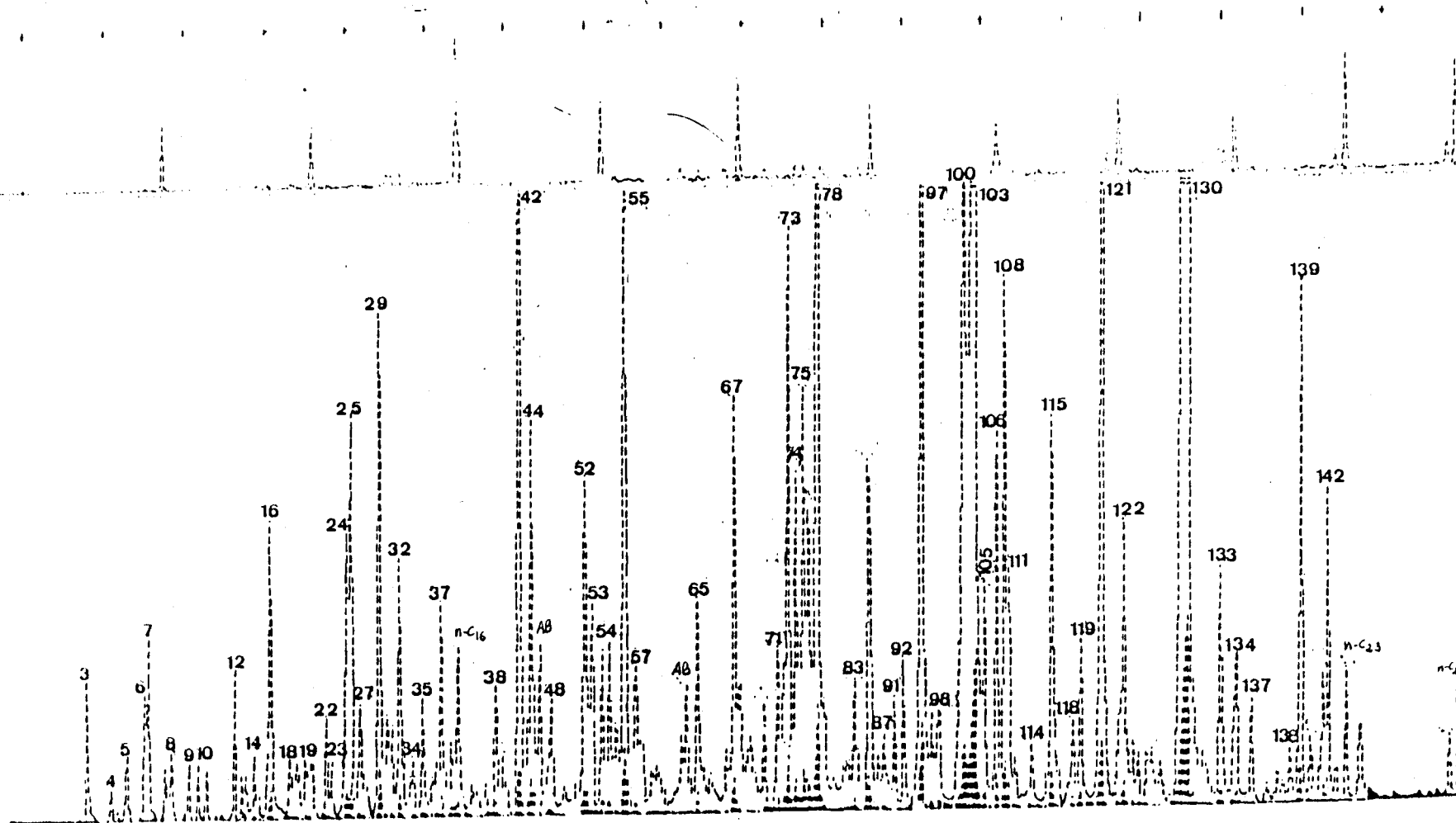
(Tan y Heit , 1981) , y su presencia exclusiva en el suelo de la hoguera de pino permite suponer que se originaría en la degradación térmica del triterpeno $C_{25}H_{42}$, aislado en el suelo de pinar , y propiciada por las mayores temperaturas de combustión de las hogueras .

Por último , es interesante destacar que las hogueras de biomasa de pino producen una mezcla de compuestos muy parecida a la de los incendios , con ligeras diferencias atribuibles a las distintas condiciones de aireación.

IV.3.4. Hornos de producción de carbón vegetal de pino , alcornoque y eucalipto . (tierras de cubiertas y carbones)

En las figuras 20 a 25 se muestran los cromatogramas de ión total de las muestras de tierras de cubierta de los hornos de producción de carbón vegetal (SCBP , SCBA y SCBE) y de los carbones respectivos (CP , CA y CE) , y en la tabla R-4 la naturaleza y contenidos de los componentes individuales aislados en las mismas .

Los únicos compuestos que no se identificaron por comparación de sus tiempos de retención y espectros de masas con los tabulados o anteriormente publicados fueron los números 74 y 75 . Estos compuestos se diferencian en tiempo de retención, pero tienen el mismo espectro de masa siguiente :



131

Figura 20

Cromatograma de ión total de la muestra SCBP. Fracción de cloruro de metileno

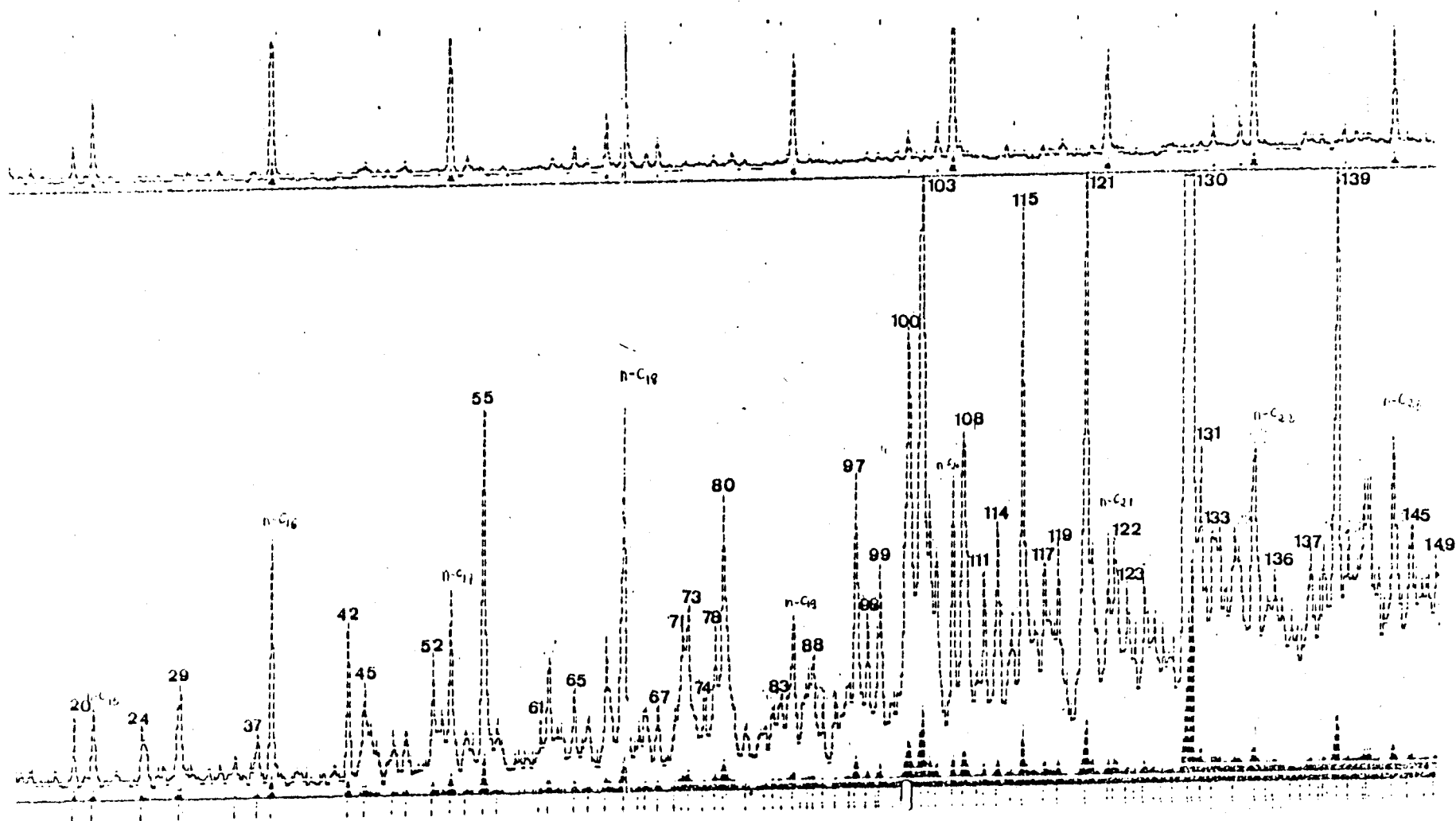


Figura 21
 Cromatograma de ión total de la muestra SCBA. Fracción de cloruro de metileno

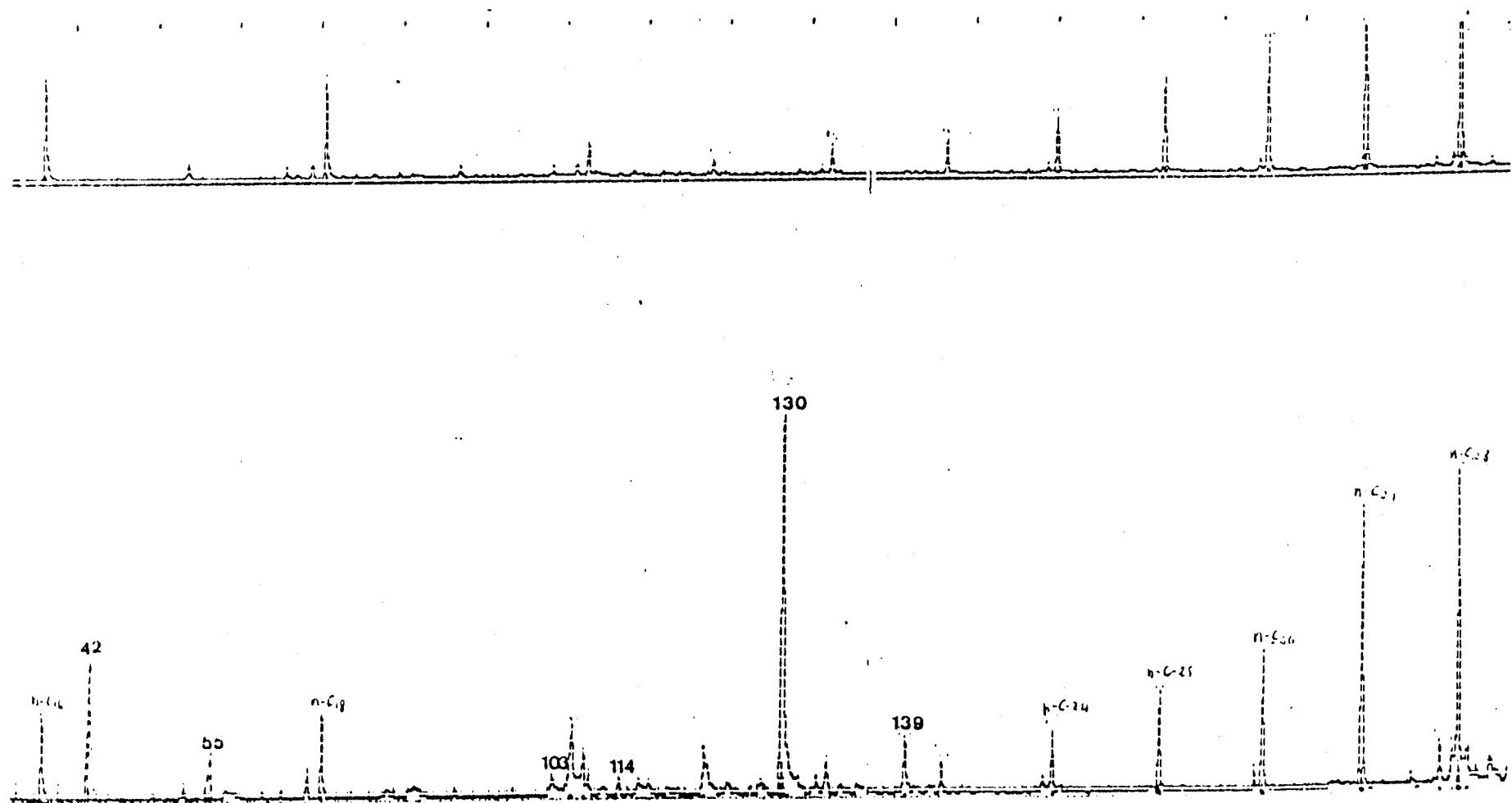


Figura 22

Cromatograma de ión total de la muestra SCBE, Fracción de cloruro de metileno

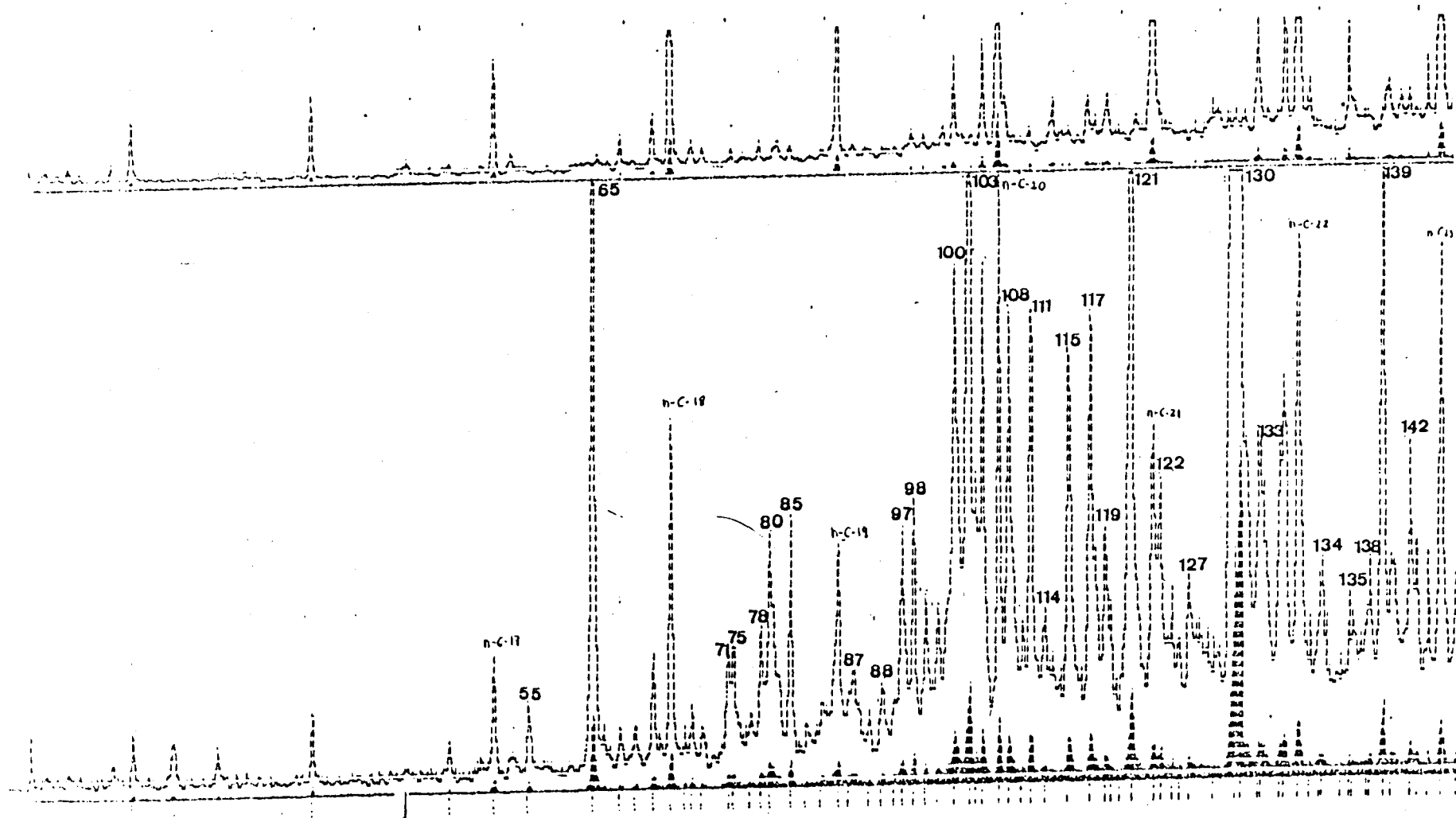


Figura 23

Cromatograma de ión total de la muestra CP. Fracción de cloruro de metileno

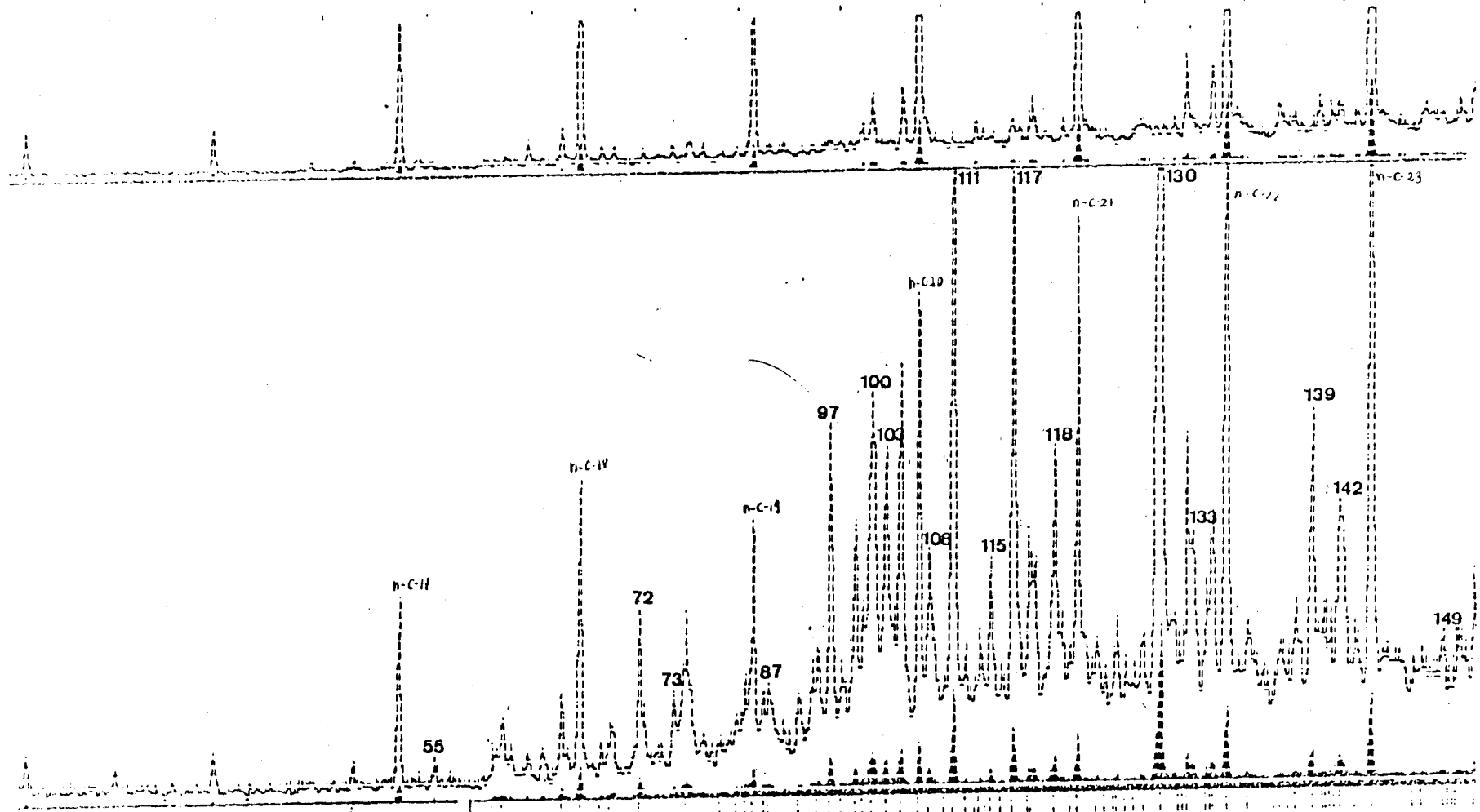
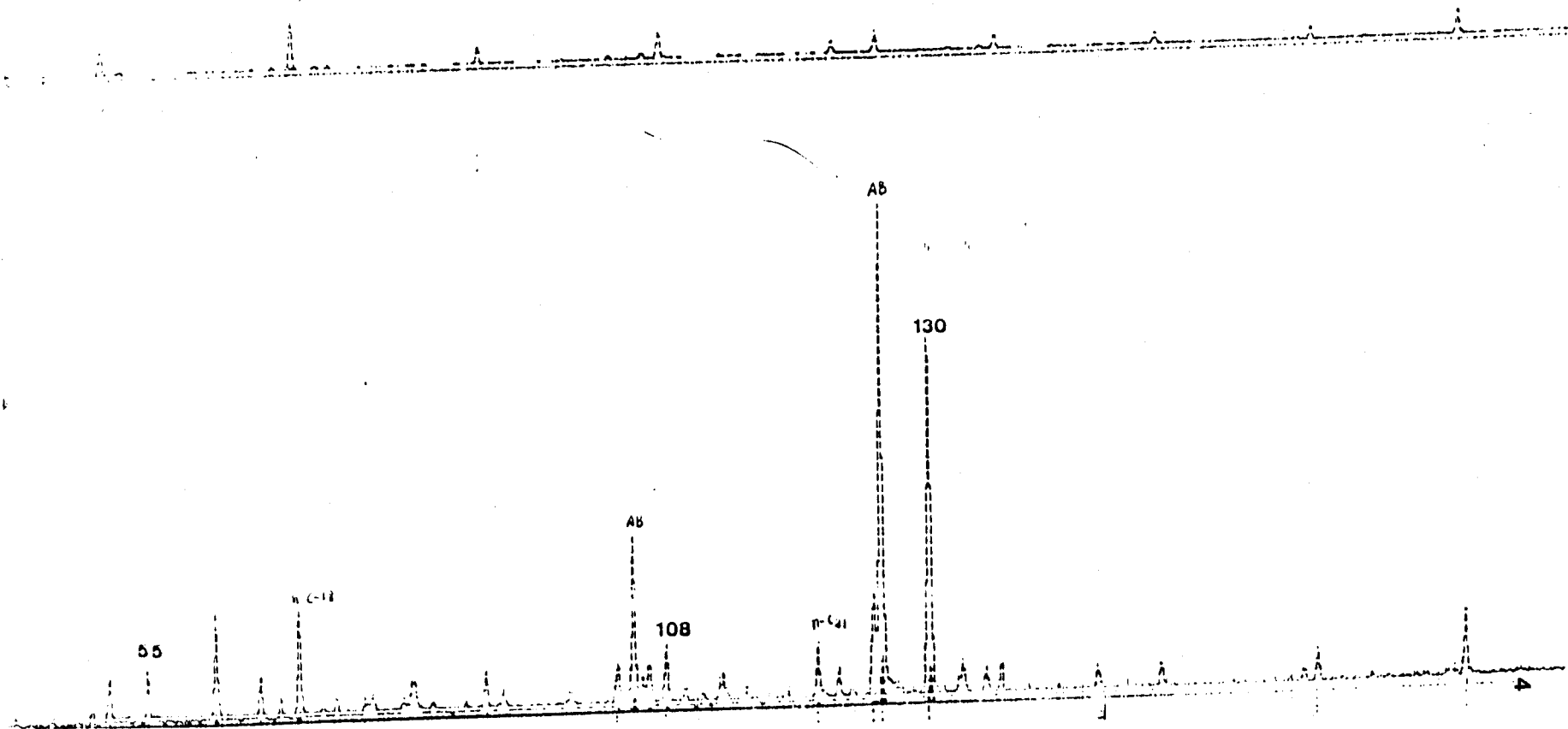


Figura 24

Cromatograma de ión total de la muestra CA. Fracción de cloruro de metileno



136

Figura 25

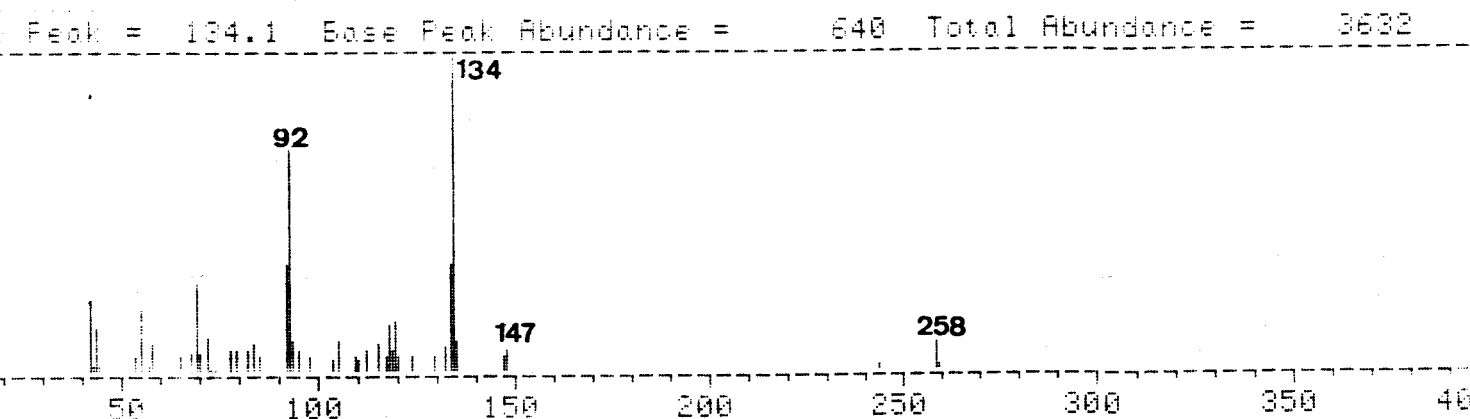
Cromatograma de ión total de la muestra CE. Fracción de cloruro de metileno

137
TABLA R-4

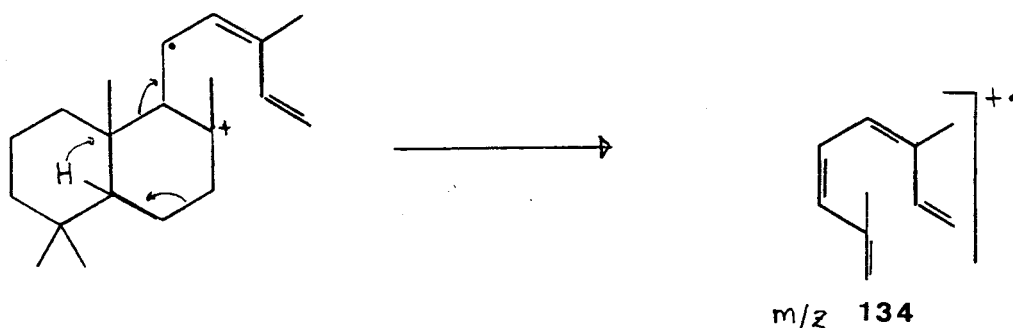
| pico nr. | compuesto | SCBP | SCBA | SCBE | CP | CA | CE |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|----|----|----|
| 3 | difenilo | 48 | - | - | - | - | - |
| 4 | etilnaftaleno | 16 | - | - | - | - | - |
| 5 | 2,7-dimetilnaftaleno | 22 | - | - | - | - | - |
| 6 | 1,3-dimetilnaftaleno | 41 | - | - | - | - | - |
| 7 | 1,6-dimetilnaftaleno | 78 | - | - | - | - | - |
| 8 | 2,3-dimetilnaftaleno | 20 | - | - | - | - | - |
| 9 | 1,2-dimetilnaftaleno | 18 | - | - | - | - | - |
| 10 | isopropilnaftaleno | 16 | - | - | - | - | - |
| 12 | 4-metilbifenilo | 43 | - | - | - | - | - |
| 13 | 2,6-di(t-butil)-benzoquinona | - | 18 | - | - | - | - |
| 14 | tetrahidroeuadaleño | 19 | - | - | - | - | - |
| 16 | dibenzofurano | 87 | - | - | - | - | - |
| 18 | C3-naftaleno | 17 | - | - | - | - | - |
| 19 | C3-naftaleno | 13 | - | - | - | - | - |
| 20 | 2,6-di(t-butil)p-cresol | - | 18 | - | - | - | - |
| 22 | C3-naftaleno | 29 | - | - | - | - | - |
| 23 | C3-naftaleno | 10 | - | - | - | - | - |
| 24 | C3-naftaleno | 85 | - | - | - | - | - |
| 25 | C4-naftaleno | 98 | - | - | - | - | - |
| 27 | C4-naftaleno | 27 | - | - | - | - | - |
| 29 | euadaleño | 148 | - | - | - | - | - |
| 32 | tetrahidro-5,6,7,8-cadaleño | 78 | - | - | - | - | - |
| 34 | C4-naftaleno | 12 | - | - | - | - | - |
| 35 | xanteno | 32 | - | - | - | - | - |
| 37 | fenil-benzaldehido | 59 | - | - | - | - | - |
| 38 | C5-naftaleno | 37 | - | - | - | - | - |
| 42 | cadaleño | 249 | 44 | 14 | - | - | - |
| 44 | C5-naftaleno | 110 | - | - | - | - | - |
| 45 | metil-fluoreno | - | 33 | - | - | - | - |
| 48 | C5-naftaleno | 25 | - | - | - | - | - |
| 52 | C5-naftaleno | 92 | 34 | - | - | - | - |
| 53 | 1,1-dimetil-2-(3-metil- heptatetraen-1,3,5,8-ilo) tetrahidrobenceno | 36 | - | - | - | - | - |
| 54 | diethylbifenilo | 34 | - | - | - | - | - |
| 55 | fenantreno | 243 | 99 | 8 | 9 | 3 | 4 |
| 57 | isómero del 53 | 27 | - | - | - | - | - |
| 61 | 1,2-di(p-tolil)etano | - | 14 | - | - | - | - |
| 65 | p-cumilfenol | 53 | 18 | - | 85 | - | - |
| 67 | 1,1,3-trimetil-2-(3-metil- heptatetraen-1,3,5,8-ilo) tetrahidrobenceno | 112 | - | - | - | - | - |
| 71 | 3-metilfenantreno | 32 | 52 | - | 17 | - | - |
| 72 | o-terfenilo | - | - | - | - | 14 | - |
| 73 | 2-metilfenantreno | 195 | 27 | - | 15 | - | - |
| 74 | 1,1,4a-trimetil-7-etil- decahidro-1,2,3,4,4a,4b,5,6, 10,10a-fenantreno | 110 | - | - | - | - | - |
| 75 | isómero del 74 | 140 | - | - | - | - | - |
| 78 | 9-metilfenantreno | 305 | 42 | - | 21 | 7 | - |
| 80 | 1-metilfenantreno | - | 72 | - | - | - | - |
| 83 | 13-metilpodocarpa-8,11,13-trieno | 44 | 19 | - | - | 7 | - |
| 87 | dihidropireno | 10 | - | - | 6 | 6 | - |
| 88 | isómero del 83 | 32 | 15 | - | 5 | - | - |

TABLA R-4(cont.)

| pico nr. | compuesto | SCBP | SCBA | SCBE | CP | CA | CE |
|-------------|--------------------------------------------------------------------|------|------|------|-----|-----|----|
| 92 | 1,2-di(p-etilfenil)etano | 42 | - | - | - | - | - |
| 97 | 19-norabietatrieno | 325 | 103 | - | 24 | - | - |
| 98 | 1-metil-7-isopropil-hexahidro- 1,2,3,4,9,10a-fenantreno | 19 | 28 | - | 24 | - | - |
| 99 | dimetilfenantreno | - | 33 | - | 16 | - | - |
| 100 | dehidroabietina | 211 | 138 | - | 50 | 24 | - |
| 103 | pimantreno | 485 | 209 | 8 | 98 | 23 | - |
| 105 | dimetilfenantreno | 41 | 32 | - | - | - | - |
| 106 | 1,4a-dimetil-7-isopropil- hexahidro-1,2,3,4,9,10- fenantreno | 109 | - | - | - | - | - |
| 108 | 9-isopropilfenantreno | 160 | 90 | - | 42 | 14 | 5 |
| 111 | 1-etilantracendiona | 20 | 40 | - | 46 | 102 | - |
| 114 | pireno | 19 | 67 | 4 | 13 | - | - |
| 115 | norsimonellita | 116 | 157 | - | 41 | 13 | - |
| 117 | etilantracendiona | - | 43 | - | 47 | 56 | - |
| 118 | C3-fenantreno | 23 | - | - | - | - | - |
| 119 | isómero del 106 | 42 | 35 | - | - | - | - |
| 121 | 1-metil-7-etilfenantreno | 283 | 195 | - | 107 | 27 | - |
| 122 | C3-fenantreno | 84 | 39 | - | 13 | - | - |
| 123 | tetrahidroretano | - | 32 | - | 8 | - | - |
| 130 | reteno | 718 | 807 | 28 | 620 | 247 | 34 |
| 131 | C4-fenantreno | - | 45 | - | - | - | - |
| 131# | bisnordehidroabietato de metilo | - | 35 | - | - | - | - |
| 133 | C4-fenantreno | 63 | 39 | - | 25 | 12 | - |
| 134 | C4-fenantreno | 38 | - | - | 13 | 6 | - |
| 135 | C4-fenantreno | 25 | 33 | - | 7 | - | - |
| 137 | C5-fenantreno | 65 | 66 | - | 22 | - | - |
| 139 | homoretano | 130 | 140 | 5 | 64 | 25 | - |
| 141 | C5-fenantreno | 57 | 29 | - | - | - | - |
| 142 | dehidroabietato de metilo | 59 | - | - | - | - | - |
| 145 | tri-(t-butil)fenol | - | 30 | - | 10 | - | - |
| 149 | criseno | - | 16 | - | - | - | - |

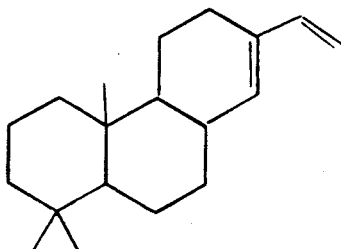


El ión a m/z 258 sería su masa molecular y correspondería a un hidrocarburo de fórmula $C_{19}H_{30}$. El ión m/z 134, pico base, es característico de los pimarenoles y se formaría por apertura del anillo central, según el mecanismo de fragmentación siguiente (Enzell y Wahlberg, 1980) :



El ión m/z 92 es el segundo en importancia y es característico de los alquil-bencenos terminales. En estos compuestos se podría originar por pérdidas de radicales alquílicos en el ión m/z 134.

El molecular corresponde, por tanto, a un derivado alquílico de decahidrofenantreno, y admitiendo la estructura pimarano los compuestos mencionados podrían ser dos isómeros con la estructura siguiente:



De los datos de la tabla R-4 podemos realizar las siguientes consideraciones:

1) De acuerdo con los datos avanzados en la tabla de MO-1 (pag 46), las muestras de eucalipto, tanto las tierras de cubiertas como el carbón, contienen cantidades de C.P.A. muy inferiores a las de pino y alcornoque, siendo a su vez las de pino mucho más ricas que las de alcornoque, lo que parece confirmar que el tipo de biomasa combustionada es un factor determinante de la mezcla de compuestos generados.

2) Comparando las muestras de cubiertas de boliches de pino con las de suelos de incendios y hogueras de ese

mismo material vegetal , se detecta un enriquecimiento de la mezcla de C.P.A. en la primera de ellas , lo que puede deberse a la acción de filtro de humos que realizaría la disposición de la tierra de cubierta en el boliche . Este efecto es especialmente importante en los compuestos mas volátiles que tienden a acumularse preferencialmente en los humos .

3) Las muestras de tierra de cubierta son mas ricas en C.P.A. que los correspondientes carbones , lo que parece confirmar el efecto de filtro mencionado .

4) El reteno está presente en todas las muestras , lo que confirmaría que dicho compuesto es característico de la combustión de biomasa con independencia de las condiciones en las que se realiza y del tipo de biomasa combustionada .

5) La relación pimantreno / reteno varía en las distintas muestras , indicando que la misma es función de las condiciones y tipo de biomasa combustionada .

6) La presencia minoritaria de derivados bifénlicos y compuestos de mas de tres ciclos parece indicar que los fenómenos de pirólisis de lignina y n-alcanos están minimizados.

7) La abundancia de compuestos naftalénicos en la tierra de cubierta de boliche de pino parece indicar que dicha biomasa es rica en sesquiterpenos .

8) La ausencia de fluoreno y las cantidades minoritarias de metilfluorenos permite suponer que los procesos de oxidación y descarboxilación de los derivados

alquilicos de fenantreno apenas tienen lugar , y ello se puede asociar a las particulares condiciones de aireación, semipirólisis, en las se produce la combustión de la leña en los hornos , tal como se ha mencionado al describir la selección de las distintas muestras .

A los compuestos de la serie degradativa de los ácidos resinicos sólo hay que añadir la detección de los compuestos intermedios descritos en la degradación del ácido pimárico (números 74 y 75) , como consecuencia del enriquecimiento de las tierras de cubierta .

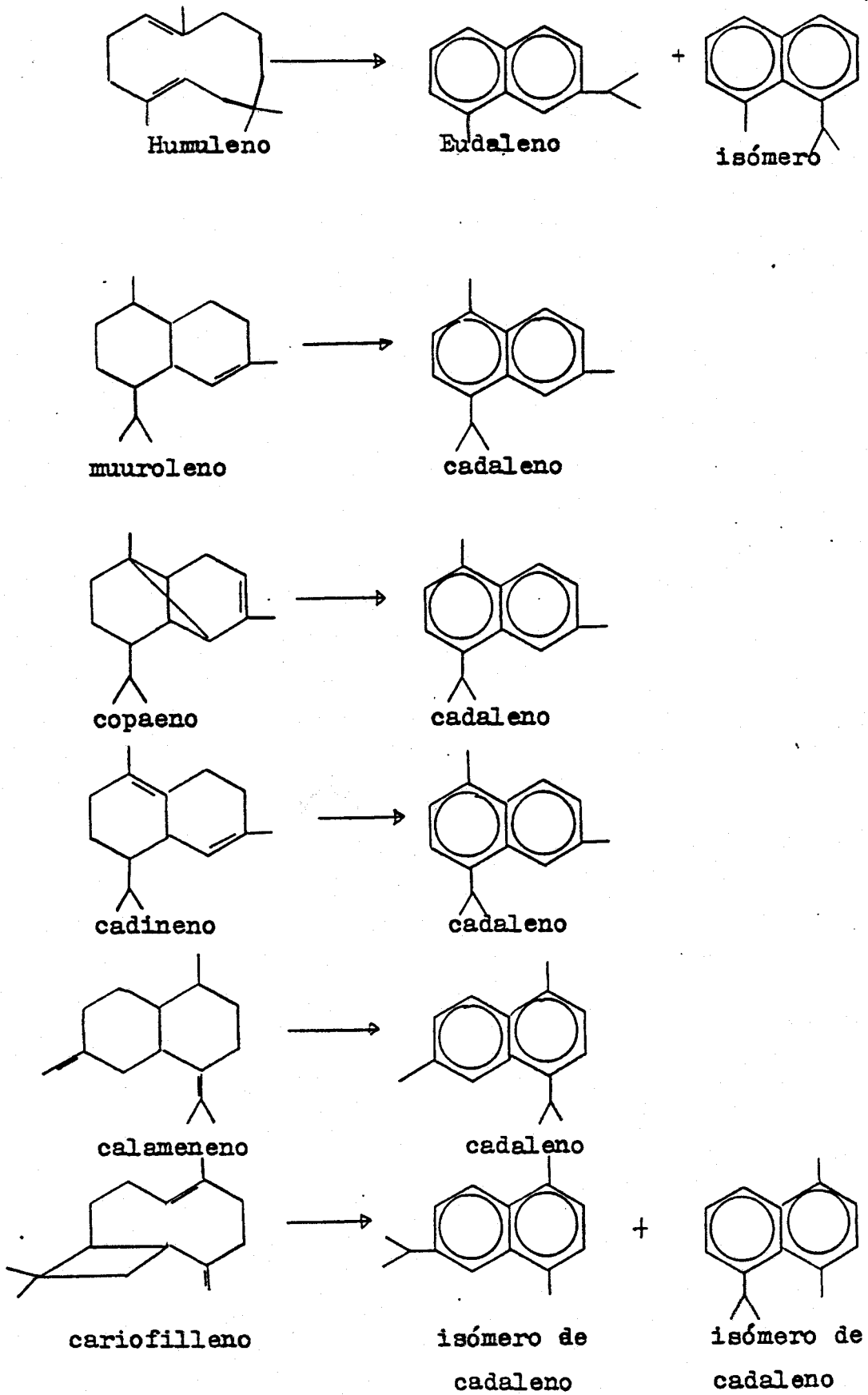
Los incrementos de fenantreno y sus derivados monoalquílicos en las muestras de tierra de cubierta con respecto a los carbones del mismo material , sugieren que el calentamiento prolongado de pimantreno y reteno depositados en las cubiertas de tierra de los hornos contribuye al aumento de los procesos secundarios de desalquilación parcial que se mencionaron en el estudio de los suelos de incendio de pinar .

Ya se ha señalado que la diferente composición de posibles precursores biológicos en las distintas especies vegetales influye en el tipo de compuestos generados en la combustión. Este hecho se confirma al analizar los compuestos naftalénicos aislados en la muestra de la tierra de cubierta de boliche de pino . De forma genérica se mencionan en la literatura a los sesquiterpenos como los precursores de los derivados alquilicos de naftaleno , citándose algunos compuestos concretos según las distintas especies vegetales (Schmeltz et al , 1976 ; Simoneit y

Mazurek , 1980) . En el caso de los pinos los sesquiterpenos mas abundantes son cadineno , guaioleno , calameno , humuleno , copaeno , cariofilleno y farneseno (Gleizes et al , 1984) , y en base a ellos se puede explicar la presencia de distintos isómeros de eudaleno y cadaleno en la muestra citada tal como se propone en el esquema R- 10 . No obstante , la presencia de C-3 y C-2 naftalenos denota que también se han producido fenómenos de desalquilación parcial análogos a los de pimantreno y reteno o incluso otros procesos complementarios . Así , por ejemplo , la especial abundancia de 2,6-dimetilnaftaleno puede deberse a la transformación térmica de carotenoides , de forma similar a como se ha realizado en experiencias de laboratorio (Ishiwatari y Fukushima , 1979) , lo que explicaría asimismo la presencia puntual de algunos derivados de carotenos como los compuestos números 53 , 57 y 67 .

Por último, la presencia en las muestras de compuestos que no se generan directamente en la combustión como los antracendiónicos permite matizar que las biodegradaciones que los producen deben transcurrir en la parte leñosa del propio árbol y no en el suelo , lo que explicaría su aislamiento en los carbones de pino y alcornoque .

El conjunto de estos datos permite suponer que las insuficientes condiciones de aireación de las muestras de boliches provoca la disminución de los procesos de oxidación y descarboxilación y que el aumento de la importancia de la desalquilación es consecuencia del



calentamiento prolongado de los compuestos depositados en las tierras de cubierta . Igualmente , la mezcla de C.P.A. generados en la combustión varía con la especie vegetal , siendo muy similares a los casos de los suelos de los incendios salvo en los compuestos mas volátiles y en los producidos en las condiciones específicas que prevalecen en los boliches . En estas muestras tampoco se detectan cantidades importantes de C.P.A. de acción cancerígena , lo que parece confirmar que se trata de una característica de la combustión de biomasa .

V. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados , del desarrollo del trabajo experimental y la discusión de los resultados obtenidos podemos extraer las conclusiones siguientes :

1) El protocolo analítico diseñado se revela como un procedimiento adecuado para el análisis de C.P.A. en muestras de suelos , dada su gran sensibilidad y su excelente reproducibilidad cualitativa . Asimismo ,el escaso tiempo necesario para el análisis total , tres horas , mejora sensiblemente el de otros protocolos propuestos en la literatura permitiendo minimizar los procesos de fotodescomposición de los C.P.A., así como su utilización como método rutinario de laboratorio .

2) El análisis de las muestras seleccionadas ha permitido establecer que las diferencias en el perfil de C.P.A. detectados en las mismas estan asociadas a las diferentes condiciones de combustión y al tipo de biomasa combustionada . Al mismo tiempo , se han concretado los procesos específicos ligados a dichas circunstancias responsables de la formación de C.P.A. a partir de precursores biológicos , tan sólo esquematizados de forma genérica en la literatura , y que responden a transformaciones de sesquiterpenos , lignina , ácidos resínicos y pirólisis de n-alcenos .

3) La via ordinaria de introducción de C.P.A. en los suelos soportes de combustión de biomasa es la incorporación de necromasa parcialmente combustionada a los mismos , ya que se ha observado que el carbono orgánico total aumenta en la capa 0 a 10 cm de los suelos quemados

con respecto a los respectivos testigos y que dicha materia orgánica disminuye en el transcurso del tiempo bien por transformación de la misma, especialmente de los restos lignínicos, o por lavado de los horizontes superficiales. No obstante, el carbono orgánico total no es una medida de la cantidad de C.P.A. aportado al suelo ya que ésta sólo constituye una pequeña parte del conjunto de sustancias orgánicas del mismo, y así, por ejemplo, en suelos quemados de gran contenidos en alcanos, como en los de rastrojeras y en los de quema de material de poda de olivo, o en polifenoles, como en la tierra de cubierta de boliche de eucalipto, no existe proporcionalidad entre la cantidad global de C.P.A. y el contenido en materia orgánica. Sin embargo, el tanto por ciento de C.P.A. en lípidos solubles en cloruro de metileno de cada muestra si es un índice de la transformación térmica de los precursores vegetales, y así, por ejemplo, las muestras mas ricas en C.P.A., las de hornos de carbón vegetal de pino y alcornoque que estan enriquecidas en C.P.A. por el efecto de filtro de humos, tienen valores altos del mencionado tanto por ciento, 3.93 y 0.46 respectivamente.

4) Las cantidades globales de C.P.A. en los suelos soportes de combustión de biomasa varían en función de las especies vegetales, siendo el orden decreciente de contenido: pino, alcornoque, olivo, rastrojera de cereal y eucalipto. No obstante, este orden no es el mismo en los todos los procesos generadores de C.P.A., y así, por

ejemplo , la pirólisis de n-alcanos es mucho mas importante en la rastrojera de cereal que en las restantes muestras.

5) La transformación térmica de sesquiterpenos produce derivados alquílicos de naftaleno , siendo los productos más importantes eudaleno y cadaleno . La mayor volatilidad de los compuestos de esta serie hace que se detecten con dificultad en los suelos soportes de combustión de biomasa . No obstante , la mayor diversidad de sesquiterpenos del pino hace que se detecten isómeros de eudaleno y cadaleno que no aparecen en las demás especies vegetales como ocurre , por ejemplo , con la transformación térmica de cariofilleno . Se ha observado que el calentamiento prolongado de los derivados naftalénicos depositados en las tierras de cubierta de los hornos de producción de carbón vegetal provoca la desalquilación parcial y / o la isomerización de dichos compuestos originando derivados C-2 y C-3 nafatlénicos de diversa naturaleza.

6) La transformación térmica de lignina es muy heterogénea en la combustión de biomasa , originándose productos bifenílicos y unidades estructurales complejas susceptibles de ulteriores biodegradaciones en el suelo . Sin embargo , se ha observado que la lignina del pino es la que genera mayor cantidad de productos bifenílicos por transformación térmica directa y por el contrario no se generan productos de esta serie en la rastrojera de cereal ni en el eucalipto .

7) La degradación térmica de los ácidos

resínicos genera derivados alquílicos de fenantreno , siendo los mas importantes pimantreno y reteno . Se ha observado que la relación pimantreno / reteno esta ligada a la proporción de los ácidos pimárico / abiético en las distintas especies vegetales , y así , por ejemplo , la cantidad de pimantreno es mayor que la de reteno en el suelo soporte de combustión de leña de olivo y en el caso del pino sucede lo contrario . Los compuestos generados en la transformación tèrmica de los ácidos resínicos son los mas persistentes in situ , se han detectado en muestras de hogueras después de cien años , y ello es consecuencia de su menor fotodescomposición y de su escasa solubilidad en agua . Sin embargo , cuando las condiciones de aireación son buenas los derivados alquílicos de fenantreno sufren oxidaciones y descarboxilaciones originando fluoreno y sus derivados alquílicos , constituyendo un proceso ligado a las condiciones de aireación. Asimismo , el calentamiento prolongado de los compuestos fenantrénicos , tal como ocurre en las tierras de cubiertas de los hornos de carbón vegetal , provoca la desalquilación e isomerización de dichos compuestos . No obstante , reteno se detecta en todas las muestras estudiadas por lo que , aún teniendo en cuenta su posible formación por mecanismos diagenéticos, se puede considerar como marcador biológico de la combustión de biomasa .

B) La pirólisis de alcanos genera C.F.A. de más de tres ciclos , habiéndose comprobado que dicho proceso está minimizado en la combustión de biomasa de los incendios y

sólo merece consideración en el caso del incendio de rastrojera de cereal .

9) Las cantidades de C.P.A. con actividad cancerígena y / o mutagénica demostrada que se detectan en los suelos de incendios y de otras formas de combustión controlada de biomasa , no sólo son considerablemente inferiores a los generados en el uso de combustibles fósiles, sino que carecen de toda relevancia cuantitativa por lo que puede afirmarse que los incendios no constituyen una fuente de C.P.A. nocivos para la salud humana .

VI. BIBLIOGRAFIA

Almendros , G. ; Polo , A. ; Ibàñez, J. y Lobo , M. C.
(1984). " Contribución al estudio de la influencia de los
incendios forestales en las características de la materia
orgànica del suelo ". Rev. Ecol. Biol. Sol. , 21 , 7-20 .

Almendros , G. ; Polo , A. ; Ibàñez, J. y Lobo , M. C.
(1984). " Transformaciones del humus por ignición en
condiciones controladas de laboratorio ". Rev. Ecol. Biol.
Sol. , 21 , 145-160 .

Almendros , G ; Martín , F y González Vila , F. J. (1986)
" Efectos de los incendios forestales sobre los
constituyentes orgànicos del suelo ". Rev. Ecol. Biol. Sol.
(en prensa).

Anders , D. E. y Robinson , W. E. (1971). " Cicloalkane
constituents of the bitumen from Green River Shale ".
Geochim. Cosmochim. Acta , 35 , 661-678.

Atlas, E. L. , Donnelly , K. C. , Giam , C. S. y Mcfarland ,
A. R. (1985). " Chemical and biological characterization
of emissions from a fireperson training facility ". Am. Ind.
Hyg. Assoc. J. , 49 , 532-540 .

Attar , A (1982) . " Funtional groups and heteroatoms in
coal " en Coal Structure , Cap. V , pp 131-198 ; ed. Meyers,
R. A. Academic Press.

Badger , G. M. (1969). " Aromatic character and aromaticity ". Cambridge University Press .

Bara , S. y Vega , J. A. (1984). " Efects of wildfire on forest soil in the N.W. of Spain". Freiburger Waldschultz Abhandlungen. Bend 4 . D.F.G. Simposium Fenero Kologie , 181-195 .

Becher , G. , Bjorseth , A. y Olufsen , B. (1981) . "Application of gas chromatography for determination of potencial hazardous compounds in work place environments ". A.C.S. symposium series , 149 , 369-381 .

Beernaert , H. (1979). " Gas chromatographic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons ". J. of Chromatogr. , 173, 109-118.

Bjorseth , A. y Eklund , G. (1979) . " Analysis for polynuclear aromatic hydrocarbons in working atmospheres by computerized gas chromatography - mass spectrometry ". Analytica Chimica Acta , 105 , 119-128 .

Blumer , M. (1976). " Polycyclic aromatic compounds in Nature " Scientific American , 234 , 35-45.

Borwitzky , H. y Schomburg , G. (1979). " Separation and identification of polynuclear aromatic compounds in coal tar by using glass capillary chromatography including combined gas chromatography- mass spectrometry ". J. Chromatogr. , 170 , 99-124.

Burns , K. A. y Villeneuve , J. P. (1983). " Biochemical processes affecting the distribution and vertical transport of hydrocarbons residues in the coastal Mediterranean ". Geochim. Cosmochim. Acta , 47 , 995-1006 .

Chapman , P. M. , Romberg , G. P. y Vigers G. A. (1982) . " Design of monitoring studies for priority pollutants " . Journal W.P.C.F. , 54 , 292-297 .

Chistensen , R. G. ; Hertz , H. S. ; Meiselman , S y White, E V. (1981) " Liquid chromatograph / Mass spectrometer interface wiht continuous sample preconcentration ". Anal. Chem. , 53 , 171-174 .

Chmielowiec , J. y George , A. E. (1980). " Polar bonded-phase sorbents for high perfomance liquid chromatography of P.A.H.". Anal. Chem., 52 , 1154-1157.

Choudhury , D. R. y Bush , B. (1981) " Chromatography - spectrometric identification of airborne polynuclear aromatic hydrocarbons ". Anal. Chem. , 53 , 1351-1356.

Ciusa , W. y Morgante , A. (1980) . " La presenza di idrocarburi policiclici aromatici come metaboliti naturali in substrati biologici ". Igiene Moderna , 75 , 748-770 .

Coates , J. T. , Elzerman , A. W. y Garrison , A. W. (1986). " Extraction and determination of selected polycyclic aromatic hydrocarbons in plant tissues " J. Assoc. Off. Chem. 69 , 110-114 .

De Bano , L. F. (1971) " The effect of hydrophobic substances on water movement in soil during infiltration ". Soil Sci. Soc. Am. Proc. , 35 , 340-343 .

De Bano , L. F. , Mann , L. O. y Hamilton , D. A. (1970) " Traslocation of hydrophobic substances into soil by burning organic litter ". Soil Sci. Soc. Am. Proc. , 34 , 130-133 .

Diaz Fierros , F. , Gil Sotres , F. , Cabaneiro , A. , Carballas , T. , Leiras , M. C. y Villar , M.C. (1982). " Efectos erosivos de los incendios forestales en suelos de Galicia ". An. Edaf. y Agrobiol. , 41 , 627-639 .

Ellwardt , P. Chr. (1977). " Variation in content of P.A.H. in soil and plant by using municipal waste compost in agriculture ". Soil organic matter studies . Volumen II , pags 291-238 . I.A.E.A.

Enzell , C. R. y Wahlberg , I. (1980) en " Biochemical applications of mass spectrometry " , Cap. XXIII , pp 312-367 ; ed. Waller , G. R. y Denner , O. C.

Fieser , L. F. y Fieser , M. (1955). en " Natural products related to phenanthrene " , Cap. II , pp 54-56 ; ed. Fieser , L. F. y Fieser , M.

Genge , C. A. (1959) " Resin acids analysis by mass spectrometry as methyl esthers ". Anal. Chem. , 31, 1750-1759 .

Giger, W. y Schaffner Ch. (1978) . " Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment by glass capyllary gas chromatography " . Anal. Chem. , 50 , 243-249 .

Giger , W. y Blumer , M. (1974). " Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment : isolation and characterization by chromatography visible , ultraviolet and mass spectrometry ". Anal. Chem. , 46 , 1663-1671 .

Giovannini , G. y Luchesi , S. (1983) " Effect of fire on hydrophofic and cementing substances of soil aggregates". Soil Science , 136 , 231-236 .

Giovannini , G. ; Luchesi , S. y Cervelli , S. (1983). " Water-repellent substances and aggregate stability in hydrophobic soil ". Soil Science , 135 , 110-113.

Giovannini , G. , Luchesi , S y Giachetti , M. (1987).

" The natural evolution of a burned soil : a three-year investigation ". Soil Science , 143 , 220-226 .

Griest , W. H. y Caton , J. E. (1983) . " Extraction of P.A.H. for quantitative analysis " . Cap. 3 , Pags 95-148 . Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons ; ed. Bjorseth, A.

Grimmer , G. , Jacob , J. y Klaus-Werner , N. (1983) . " Characterization of CH₂-homologous azaarenes in petroleum by gas chromatography and mass spectrometry ". Anal. Chem , 55 , 2398-2304 .

Grob , K. , Grob , K.Jr y Grob , G. (1975). " Organic substances in potable waters and its precursors . III. The closed-loop stripping procedure compared with rapid liquid extraction ". J. Chromatogr. , 106 , 299-315 .

Guenther , E. , Gilbertson , G. y Koenig , R. T. (1975) . " Essential oils and related products ". Anal. Chem. , 47 , 139R-157R .

Haagen-Smit , A. J. y Nimmo , C. C. (1962) en Comprehensive Biochemistry , Vol , 9 . Cap. V , pp 115 -168; ed. Florkin , M y Stotz , E. H.

Hangebrauck , R. F. , von Lehmden , D. J. y Meeker , J. E. (1967) . " Sources of polynuclear hydrocarbons in the atmosphere " . Bureau of Disease Prevention and Environmental Control , pags 3-20 . U.S. Department of Health , Education and Wilfare .

Hare , A. y Hites , R. A. (1976) . " On the origin of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments : biosynthesis by anaerobic bacteria " *Geochim. Cosmochim. Acta* , 40 , 1141-1143 .

Hilpert , L. R. , May , W. E. , Wise , S. A. , Chesler , S. N. , y Hertz , H. S. (1978) . " Interlaboratory comparison of determination of trace level petroleum hydrocarbon in marine sediments " . *Anal. Chem.* 50 , 458-469 .

Hrudey , S. E. , Perry , R. y Wellings , R. A. (1974) . " The composition of residues from municipal refuse incinerators " . *Environmental Research* , 7 , 294-302 .

Ibanez , J. , Lobo , M. C. , Almendros , G. y Polo , A. (1983) . " Impacto del fuego sobre algunos ecosistemas edáficos del clima mediterráneo continental de la zona centro de España " . *Bolet. Est. Cent. Ecolog.* , 12 , 27-42.

Ishiwatari , R. y Fukushima , K. (1979). " Generation of unsaturated and aromatic hydrocarbons by thermal alteration of young kerogen ". Geochim. Cosmochim. Acta , 43 , 1343-1349 .

Jackson , J. O. y Cupps , J. A. (1978) . " Field evaluation and comparison of sampling matrices for polynuclear aromatic hydrocarbons in occupational atmospheres " Cap III , pags 185-201 de Polynuclear aromatic hydrocarbons. Carcinogenesis . editado por Jones , P. W. y Freunndenthal , R. I. . Raven Press . New York .

Jacobs , B. W. y Billings , Ch. E. (1985) . "Characterization and temperature dependence of P.A.H. from emissions a simulated ribber combustion operation " . Am. Ind. Hyg. Assoc. J. , 46 , 547-554 .

Katz , E. y Ogan , K. (1980). " Selectivity factor for several P.A.H. pairs on C18 bonded phase columns ". J, Liq. Chromatogr. , 3 , 1151-1163 .

Kissin , Y. V. , Feulner , G. P. y Payne , W. B. (1986). " Gas chromatographic analysis of polymethyl substituted alkanes " J. Chromatogr. Science , 24 , 164-169 .

Knorr , M. y Schenk , G. (1968). " Synthesis of polycyclic aromatic compounds by bacteria ". Arch. Hyg. Bakteriol , 152 , 282-285 .

Komg , J. , Balfanz , E. , Funcke , W. y Romanowski , T
(1983) . " Determination of oxigenated poycyclic aromatic
hydrocarbons in airborne particulate matter by capillary gas
chromatography and gas chromatography / mass spectrometry " .
Anal. Chem. ,55 , 599-603 .

Krahn , M. M. , Collier , T. K. y Malins , D. C. (1982) .
" Aromatic hydrocarbons metabolites in fish " . J.
Chromatogr. , 236 , 441-452 .

Laflamme , R. E. y Hites , R. A. (1978) . " The global
distribution of P.A.H. in recent sediments " . Geochim.
Cosmochim. Acta , 42 , 289-303 .

Lee , F. S. C. , Prater , T. J. y Ferris, F. (1979) .
" P.A.H. emissions from a stratified-charge vehicle with and
without oxidation catalyst:sampling and analysis evaluation"
Cap II, pags 83-110 de Polynuclear aromatic hydrocarbons ,
editado por Jones , P. W. y Leber , P..Ann Arbor Science
Publs.

Lee , M. L. , Novotny , M. y Bartle , K. D. (1976) . " Gas
chromatography / mass Spectrometric and Nuclear magnetic
resonance spectrometric of carcinogenic polynuclear aromatic
hydrocarbons in tobacco and marijuana smoke condensates " .
Anal. Chem. , 48, 405-416.

Lee , M. L. y Wright , B. W. (1980). " Capillary column gas chromatography of polycyclic aromatic compounds : a review " . J. Chromatogr. Scien. , 18 , 345-358 .

Lunde , G. y Bjorseth , A. (1977). Polycyclic aromatic hydrocarbons in long-range transported aerosols ". Nature , 268 , 518-519 .

MacLeod , W. D. , Prohaska , P. G. , Gennero , D. D. y Brown , D. W. (1982). " Interlaboratory comparisons of selected hydrocarbons from marine sediments " . Anal. Chem. 54 , 386-392 .

Mallet , L. y Tissier , M. (1969). " Biosynthesis of polycyclic hydrocarbons of benzo(a)pyrene type in forest soil " . C. R. Soc. Biol. , 163 , 62-65 .

Martens , R. (1982). " Concentrations and microbial mineralization of four to six ring polycyclic aromatic in compostated municipal waste " . Chemosphere , 11 , 761-770 .

Martin , F. , Sainz-Jiménez , C. y González-Vila , F. J. (1979). " Pyrolysis-Gas chromatography-Mass spectrometry of lignins " Holzforschung , 33, 210-212 .

May , W. E. y Wise , S. A. (1984). " Liquid chromatography determination of P.A.H. in air particulate extracts " . Anal. Chem. , 56 , 225-232 .

Melgarejo , L. , Ternero , M. y Gracia, I. (1986) . " A study of the atmospheric lead pollution in Seville , Spain. Influence of meteorology and traffic , and relationship with other traffic-generated pollutants " . Inter. J. Envir. Anal. Chem. , 24 , 283-295 .

Morgante , A. (1974) . " Variazione del contenuto in idrocarburi policiclici durante il processo di maturazione delle olive " . Quaderni di Merceologia , 13 , 176-182 .

Nielsen , T. (1979) . " Determination of P.A.H. in automobile exhaust by means of high-performance liquid chromatography with fluorescence detection " . J.Chromatogr. 170, 147-156 .

Nielsen , T. (1981) . " A study of the reactivity of polycyclic aromatic hydrocarbons " . Nordic P.A.H-project , report 10 . Central Institute for industrial research,Oslo.

Nimz , H. (1974) . " Beech lignin . Proposal of a constitutional scheme " . Angew. Chem. Internat. Edit. , 13 , 313-321 .

Nishioka , M. , Jones , B. A. , Tarbet , B. J. , Bradshaw , J. S. y Lee , M. L. (1986) . " Gas chromatographic retention behavior of P.A.C. on smetic liquid-crystalline polysiloxane stationary phases " . J. of Chromatogr. , 357 , 79-91 .

Ohta , K. , Handa , N. y Matsumoto , E. (1983). " Trends and factors governing P.A.H. levels in Tokyo Bay sediments" *Geochim. Cosmochim. Acta* , 47 , 1651-1654 .

Ortiz de Serra , M. I. y Schnitzer , M. (1973). " The chemistry oh humic and fulvic acids extracted from argentine soils ". *Soil Biol. Biochem.* , 5 , 281-286 .

Plata , G y Guitiani , F. (1966). " Transformaciones experimentadas en el suelo por la acción del fuego ". *An. Edaf. y Agrobiol.* , 25 , 57-88 .

Radke , M. , Willsch , H. y Leythaeuser , D. (1982). " Aromatic components of coal : relation of distribution pattern to rank ". *Geochim. Cosmochim. Acta* , 46 , 1831-1848

Ramdahl , T. (1983). " Retene , a molecular marker of wood combustion in ambient air " . *Nature* , 306 , 580-582 .

Rouvray , D. H. (1986). " De la topologia a la quimica" *Investigación y Ciencia* , 122 , 16-25 .

Ruckmick , S. C. y Hurtubise , R. J. (1985). " Liquid chromatography systems for the separation of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitrogen heterocycle compounds present in coal liquids " . *J. Chromatogr.* 321, 343-352 .

Rullkotter , J. , Aizenshtat , Z. y Spiro , B. (1984).

" Biological markers in bitumens and pyrolyzates of upper cretaceous bituminous chalks from the Ghareb formation (Israel) ". Geochim. Cosmochim. Acta , 48 , 151-157 .

Sanroque , P. , Rubio , J. L. y Mansanet , J. (1985) .

" Efectos de los incendios forestales en las propiedades del suelo , en la composición florística y en la erosión hídrica de zonas forestales de Valencia (España)". Rev. Ecol.Biol.Sol. , 22, 131-147.

Savage , S. M. , Osborn , J. , Letey , J. y Heaton , C. (1972). "Substances contributing to fire-induced water repellency in soil ". Soil Sci. Soc. Am. Proc. , 36 , 674-678 .

Schmeltz , I. ; Tosk , J. y Hoffmann , D. (1976).

" Formation and determination of naphthalenes in cigarette Smoke ". Anal. Chem. , 48 , 645-652 .

Schmid , P. y Hunter , E. (1971). " Extraction and purification of lipids.I.Solubility of lipids in biologically important solvents ". Physiol.Chem. and Physics 3 , 98-102.

Scott , L. y Prohaska , P. G. (1981). " Sephadex LH-20 chromatography of extracts of marine sediments and biological samples for the isolation of polynuclear aromatic hydrocarbons ". J. Chromatogr. , 211 , 284-289 .

Selkirk , J. K. , Croy , R. G. y Gelboin , H. V. (1974). " Benzo(a)pyrene metabolites : efficient and rapid separation by high-pressure liquid chromatography ". Science 184 , 169-170 .

Shinohara , R. ; Koga , M. ; Kido , A ; Eto , S. ; Tabata, T. y Hori , T. (1980) " Presence and behavior of organic pollutants in an aqueous environment surrounded by an industrialized area ". Environment International , 4 , 163-174.

Simoneit , B. R. T. y Mazurek , M.A. (1982). " Organic matter of the troposphere.II.". Atmospheric environment, 16, 2139-2159 .

Sirvins , A. y Tramier , B. (1986) . " La biodegradación de los hidrocarburos ". Mundo Científico , 54 , 46-54 .

Snook , M.E. ; Severson , R. F. ; Higman , H. C. ; Arrendale , R. F. y Chortyk , O. T. (1979) . " Methods of characterization of complex mixtures of polynuclear aromatic hydrocarbons ". en Polynuclear aromatic hydrocarbons , Cap. IV , pp 231-259 , ed. Jones , P. W. y Leber , P. Ann Arbor Science .

Sorrell , R. K. y Reding , R. (1979). " Analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons in environmental waters by High-pressure liquid chromatography". J. of Chromatogr. ,185 655-670 .

Spitzer , T y Kuwatsuka , S. (1986). " Simple method for determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in soil by clean-up on XAD-2 ". J. of Chromatogr. , 358 , 434-437 .

Takeda , H. , Schuller , W. E. y Lawrence , R. (1968). " Thermal isomerization of methyl abietate ". J. Chem. Eng. Data , 13 , 579 -581 .

Tan , Y. L. y Heit , M. (1981). " Biogenic and abiogenic polynuclear aromatic hydrocarbons in sediments from two remote Adirondack lakes ". Geochim.Cosmochim. Acta , 45 , 2267-2279 .

Thomson , R. H. (1965). " Quinones : nature , distribution and biosynthesis ".en Chemistry and Biochemistry of plant pigments.Cap.II ,pp 309- 332.Ed.Goodwin , T.W.

Tomkins , B. A. ; Brazell , R. S. ; Roth , M. E. y Ostrum , V. H. (1984). " Isolation of mononitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in particulate matter by liquid chromatography and determination by gas chromatography with the thermal energy analyzer ". Anal. Chem. , 56 , 781-786 .

Tong , H. Y. , Centen , J. D. , Farasek , F. W. , Jellum , E y Helland , P. (1985). " Identification of trace organic compounds in dimethyl sulphoxide solution using high-performance liquid chromatography and gas chromatography - mass Spectrometry ". J. Chromatogr. 324 , 373-383 .

Van Rossum , P. y Webb , R. G. (1978). " Isolation of organic pollutants by XAD-resins and carbon". J. of Chromatogr. , 150 , 381-388 .

Vassilaros, D.L., Stoker , P.W. , Booth , G.M. y Lee , M.L. (1982)." Capillary gas chromatographic determination of polycyclic aromatic compounds in vertebrate fish tissue ". Anal. Chem. , 54, 106-112 .

Vega , J. A. (1986). " La investigación sobre incendios forestales en España. Revisión bibliográfica". Proc. Bases Ecologiques per la Gestio Ambiental , pp 17-24 . Diputació de Barcelona .

Viro , P. J. (1974). " Effects of forest fire on soil " en Fire and ecosystems . Cap IV , pp 7-45.Ed. Kozlowski , T. y Ahlgren , C. E. . Academic Press.

Wakeham , S. G. ; Schaffner , Ch. y Giger , W. (1980). " Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent lakes sediments.I.Compounds having anthropogenic origins ". Geochim. Cosmochim. Acta , 44 , 403-413 .

Warman , K. (1983). " Organic micropollutants in stack gases . Sampling analysis and relation between emission of carbon monoxide and hydrocarbons ". Studsvik Report 83 / 1 . Sweden.

Wauters , E. , Sandra , P. y Verzele , M. (1979).
" Qualitative and semiquantitative analysis of the non-polar organic fraction of air particulate matter ". J. Chromatogr. 170 , 125-131 .

Whalen-Pedersen , E. y Jurs . P. C. (1981). " Calculation of linear temperature programmed capillary gas chromatography retention indice of polycyclic aromatic compounds". Anal. Chem. , 53 , 2184-2187 .

White , C. M. ; Sharkey , A. G. ; Lee , M. L. y Vassilaros, D. L. (1979). " Some analytical aspects of the quantitative determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in fugitive emission from coal liquefaction processes ". en Polynuclear Aromatic Hydrocarbons , pp 261-275 .Ed. Jones , P. W. y Leber , P..Ann Arbor Science.

White , C. (1983). " Determination of P.A.H. in coal derivated materials ". en" Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons " , cap XIII , pp 525 - 616 . Ed. Bjorseth , A.

White , C. M. ; Robbat , A. y Hoes , R. M. (1984).

" Evaluation of a thermionic ionization detector of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons ". Anal. Chem. , 56 , 232-236 .

Winans , R. E. , Hayatsu , R. , Mcbeth , R. L. , Scott , R. G. , Moore , L. P. y Studier , M. L. (1979).

"Characterization of hydrolytically solubilized coal ". en Coal Structure , cap. XI , pp 159-177 .Ed. Gorgaty , M. L. y Ouchi , K. . Advances in chemistry series.

Windsor , J. G. y Hites , R. A. (1979). " Polycyclic aromatic hydrocarbons in Gulf of Maine sediments and Nova Scotia soils ". Geochim. Cosmochim. Acta , 43 , 27-33 .

Wise , S. A. , Chesler , S. N. , Guenther , F. R. , Hertz , H. S. , Hilpert , L. R. , May , W. E. y Parris , R. M. (1980). " Interlaboratory comparison of determination of trace level hydrocarbons in mussels ". Anal. Chem. , 52 , 1828-1833 .

Wozniak , T. J. y Hites , R. (1985). " Analysis of hydroaromatics in coal-derived synthetic fuels : standard compounds ". Anal. Chem. , 57 , 1314-1319 .

Youngblood , W. W. y Blumer , M. (1975). " Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment : homologous series in soils and recent marine sediments". Geochim. Cosmochim. Acta , 39 , 1303-1314 .

Yu , M. y Hites , R. A. (1981). " Identification of organic compounds on diesel engine soot" Anal . Chem. , 53 , 951-954 .

Zander , M. (1983). " Physical and chemical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons " . Cap. I , pags 1-25 de Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons , ed. Bjorseth, A.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

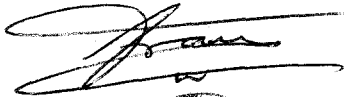
Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. José Luis López Ruiz titulada "Determinación en suelos de compuestos policíclicos aromáticos generados en la combustión de la Biomasa" acordó otorgarle la calificación de Apto "Cum laude"

Sevilla, 19 de Noviembre 1987.

El Vocál,

El Vocál,

El Vocál,



El Presidente,

El Secretario,

El Doctorado,

