

## FORMACIÓN DE ENLACES CH- $\pi$ : UN MECANISMO EFICAZ PARA LA EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EN SUELOS

Lourdes Algar Zafra, María Dolores Sicilia Criado, Soledad Rubio

Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Instituto de Química Fina y Nanoquímica. Universidad de Córdoba. Edificio Anexo Marie Curie. Campus de Rabanales, 14071-Córdoba. España

a42alzal@uco.es, www.uco.es/sac

### Introducción

El enlace CH- $\pi$  es un tipo de interacción no covalente que se produce entre grupos CH, que actúan como donadores de hidrógeno, y la nube electrónica  $\pi$  de anillos aromáticos, que actúa como aceptora de hidrógeno [1]. En este tipo de interacción intervienen fuerzas de dispersión y electrostáticas que contribuyen a la energía de enlace en diferentes grados según la naturaleza de los grupos enlazados. Para los casos que implican un anillo aromático C6 y grupos CH alifáticos, la energía de un enlace CH- $\pi$  es de aproximadamente 1,5-2,5 kcal mol<sup>-1</sup>.

Una característica destacada del enlace CH- $\pi$  es que funciona de forma cooperativa, de manera que, cada sistema  $\pi$  de un anillo aromático puede interactuar con varios grupos CH, siendo las energías de los enlaces formados aditivas [2]. En consecuencia, aunque estos enlaces son individualmente bastante débiles, pueden dar lugar a enlaces fuertes en sistemas en los que pueden producirse múltiples interacciones CH- $\pi$ .

Los disolventes supramoleculares (SUPRAS) de ácidos alquilcarboxílicos (ACA) son líquidos nanoestructurados constituidos por agregados hexagonales inversos de moléculas de ACA con un núcleo acuoso y con las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas de anfifilo dispersas en tetrahidrofurano (THF) [3] (Fig. 1). Los ACA-SUPRAS se sintetizan fácilmente mediante un proceso de autoensamblaje y coacervación, disolviendo el anfifilo en THF a temperatura ambiente y añadiendo H<sub>2</sub>O. Las moléculas de ACA forman micelas inversas en THF que al adicionar un disolvente en el que son poco solubles aumentan de tamaño dando lugar a la formación de gotas de coacervado que se agrupan y separan como una segunda fase líquida menos densa que la disolución en equilibrio. Aunque la apariencia de los ACA-SUPRAS es similar a la de cualquier disolvente, mediante microscopía óptica se puede observar su carácter discontinuo y mediante microscopía electrónica, los agregados hexagonales en cada una de las gotas de coacervado que los constituyen.

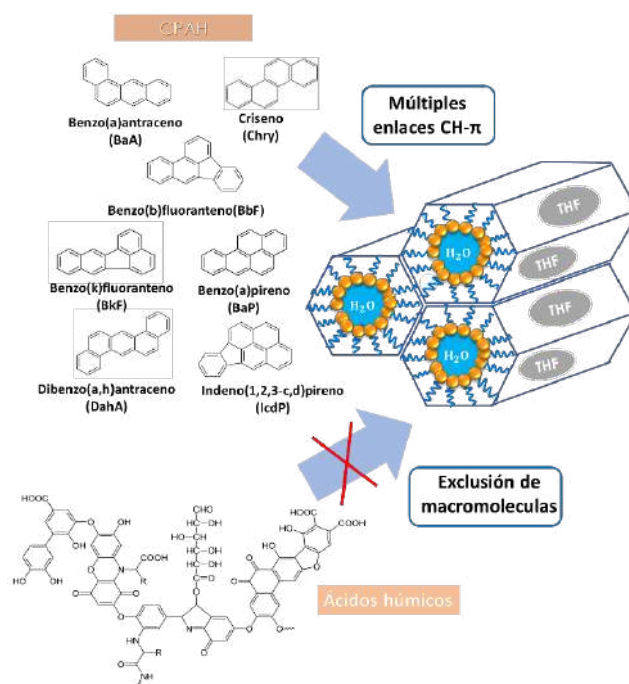


Figura 1. Estructura de los agregados de los disolventes supramoleculares de ácidos alquilcarboxílicos (ACA-SUPRAS), estructura química de los hidrocarburos policíclicos aromáticos carcinogénicos (CPAH) estudiados y mecanismo de solubilización de analitos y exclusión de interferentes.

La elevada concentración de anfifilo de estos disolventes y su contenido en THF posibilita la formación de múltiples enlaces CH- $\pi$  entre los grupos CH de las cadenas hidrocarbonadas del ACA y del TFH y los anillos de compuestos aromáticos, propiciando de este modo una eficaz solubilización de este tipo de compuestos. Además, la nanoestructura de los ACA-SUPRAS les permite actuar como materiales de acceso restringido solubilizando moléculas de bajo peso molecular mediante su incorporación a los agregados que constituyen el SUPRAS y excluyendo sustancias de gran tamaño que no acceden a los agregados debido a impedimentos estéricos.

Las características de los ACA-SUPRAS los hacen especialmente adecuados para extraer compuestos aromáticos con baja extractabilidad en muestras

complejas, como es el caso de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) en suelos. Los PAH son contaminantes procedentes de la combustión incompleta de combustibles fósiles que poseen carácter apolar y muy baja solubilidad en agua, lo que favorece su fuerte adsorción en las partículas de suelo [4] y dificulta su extracción. La extractabilidad de los PAH en suelos disminuye al aumentar el número de anillos aromáticos fundamentalmente debido al aumento de la fuerza de las interacciones con la materia orgánica del suelo, siendo los PAH con más de tres anillos aromáticos los más fuertemente retenidos. [4,5]. Dentro de esta categoría se encuentran los PAH carcinogénicos (CPAH) cuya estructura se muestra en la Fig. 1, contaminantes de especial interés en análisis ambiental por su elevada toxicidad.

La extracción de los CPAH en suelos generalmente se realiza usando Soxhlet, extracción con líquidos presurizados (PLE), asistida por microondas (MAE) o ultrasonidos (UAE). En las condiciones usadas para extraer eficazmente estos contaminantes se extraen grandes cantidades de materia orgánica del suelo, lo que obliga a realizar laboriosos procesos de limpieza de los extractos antes de su análisis cromatográfico, con frecuencia llevado a cabo usando cromatografía líquida con detección fluorimétrica (LC-FLU).

En este trabajo se ha investigado el potencial de los ACA-SUPRAS para simplificar el proceso de tratamiento de muestra usado para la determinación de CPAH en suelos basándonos en la capacidad de estos disolventes para formar enlaces CH- $\pi$  con los analitos y proporcionar extractos libres de macromoléculas.

### Selección del SUPRAS

Se sintetizaron ACA-SUPRAS con diferente composición usando ácido hexanoico (HeA), octanoico (OcA) y decanoico (DeA) y diferentes proporciones de THF y H<sub>2</sub>O. La concentración de ACA en el SUPRAS fue independiente de la longitud de su cadena hidrocarbonada, pero disminuyó desde 0,7 mg  $\mu\text{L}^{-1}$  hasta 0,2 mg  $\mu\text{L}^{-1}$  cuando la relación THF/H<sub>2</sub>O aumentó desde 0,05 v/v a 0,43 v/v. Sin embargo, la concentración total de grupos CH en los ACA-SUPRAS aumentó debido al aumento de la cantidad de THF incorporado en el disolvente supramolecular (38,7-42,3 M, 43,7-44,0 M y 47,3-44,5 M para HeA, OcA y DeA, respectivamente).

Los ACA-SUPRAS sintetizados se usaron para extraer los CPAH de una muestra de suelo a la que se le adicionaron 300  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de cada analito. Las

extracciones se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento especificado en la Fig. 2. La mezcla de suelo y disolvente se sometió a agitación vortex y posterior centrifugación para separar las partículas de suelo del extracto, que se inyectó directamente en el cromatógrafo de líquidos.

Las recuperaciones obtenidas para los CPAH utilizando los OcA-SUPRAS fueron superiores a las obtenidas usando los HeA-SUPRAS probablemente debido al mayor número de grupos CH disponibles para interactuar con los analitos. Sin embargo, las recuperaciones obtenidas utilizando los DeA-SUPRAS fueron similares a las alcanzadas con los OcA-SUPRAS, lo que sugiere que un mayor aumento del número de grupos CH en el disolvente no tiene un efecto significativo en la extracción de los CPAH. Las recuperaciones también aumentaron con la relación THF/H<sub>2</sub>O usada en la síntesis de los HeA-SUPRAS, pero esta variable no afectó a la eficacia de extracción de los OcA-SUPRAS ni de los DeA-SUPRAS.



Figura 2. Procedimiento para la extracción de los CPAH de muestras de suelo

Las elevadas recuperaciones obtenidas para todos los CPAH (por ejemplo, 86-98% con los OcA-SUPRAS) demuestran que las interacciones CH- $\pi$  que se producen en los ACA-SUPRAS permiten la extracción eficaz de los CPAH usando condiciones suaves de extracción. La capacidad de solubilización proporcionada por los ACA-SUPRAS para los CPAH es muy superior a la del THF, incluso a bajas relaciones disolvente/suelo (ej. 1,5  $\mu\text{L mg}^{-1}$ ). Así, las recuperaciones obtenidas para los CPAH

investigados utilizando extracción Soxhlet durante 24 h con una relación THF/suelo igual a 15  $\mu\text{L mg}^{-1}$  se encuentran en el intervalo 58-84% y utilizando extracción asistida por ultrasonidos durante 1 h y una relación THF/suelo igual a 1  $\mu\text{L mg}^{-1}$ , en el intervalo 60-84% [6].

Se seleccionó el Oca-SUPRAS sintetizado usando una relación THF/H<sub>2</sub>O igual a 0,05 v/v para extraer los CPAH de suelos.

### Optimización del proceso de extracción

Se ensayaron relaciones volumen de Oca-SUPRAS/ peso de muestra en el intervalo 0,6-3,0  $\mu\text{L mg}^{-1}$ , variando el volumen de disolvente entre 300 y 1.500  $\mu\text{L}$  y la cantidad de muestra entre 250 y 1.250 mg. Los tiempos de extracción ensayados estuvieron comprendidos entre 2 y 30 min. Usando un tiempo de 15 min y relaciones disolvente/muestra iguales o superiores a 1,5  $\mu\text{L mg}^{-1}$  se obtuvieron recuperaciones próximas al 100% para todos los CPAH investigados. Las desviaciones estándar aumentaron para cantidades de muestra inferiores a 500 mg, por lo que ésta es la cantidad mínima de muestra recomendada para el análisis. Las recuperaciones disminuyeron para tiempos de extracción inferiores a 10 min. Con el fin de obtener recuperaciones cuantitativas y asegurar la precisión y robustez del método de extracción se recomienda utilizar una relación disolvente/muestra igual a 1,5  $\mu\text{L mg}^{-1}$  (500 mg de muestra y 750  $\mu\text{L}$  de Oca-SUPRAS) y un tiempo de extracción de 15 min.

También se investigó el efecto en la eficacia de extracción del tiempo de contacto entre los CPAH y el suelo. Estudios previamente publicados han demostrado que la extractabilidad de los PAHs disminuye al aumentar su tiempo de contacto con el suelo. Así, por ejemplo, la recuperación obtenida para fenantreno, pireno, benzo[a]pireno y benzo[g,h,i]perileno utilizando diclorometano y PLE disminuyó del 100% al 35-50% tras 30 días de contacto entre los contaminantes y el suelo [7]. Las recuperaciones obtenidas para los CPAH estudiados usando Oca-SUPRAS como extractante no variaron tras 30 días de contacto analito-suelo, lo que corrobora la elevada eficacia del SUPRAS para romper las interacciones suelo-CPAH.

### Validación del método

En la Tabla 1 se resumen los resultados obtenidos en la validación del método desarrollado basado en extracción con Oca-SUPRAS y CL-FLU. El método permite determinar concentraciones de los CPAH a

muy baja concentración en muestras de suelo con buena precisión en términos de reproducibilidad y repetibilidad. La exactitud del método se demostró analizando un material de referencia certificado, que consistió en un suelo industrial contaminado, y muestras de suelo con diferente composición granulométrica (arena=24,8-70,5%, limo=19,7-40,1%, arcilla=9,9-35,1%), contenido en materia orgánica (0,5-5,2%) y pH (6,7-8,2) a las que se le adicionaron concentraciones conocidas de los CPAH. En todos los casos se obtuvieron recuperaciones próximas al 100% para todos los CPAH.

Tabla 1. Propiedades analíticas del método

<b>Límites de detección (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>		0,07-0,3
<b>Límites de cuantificación (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>		0,2-1,2
<b>Precisión</b>	Repetibilidad	
	Desviación estándar relativa (n=11)	2,8-5,4
	Reproducibilidad	
	Desviación estándar relativa (n=18, 3 días)	4,3-8,8
<b>Exactitud</b>	Material de referencia certificado (BAM-U013c)	
	Recuperaciones en función del valor certificado (%)	97-117
	Análisis de muestras fortificadas	
	Recuperaciones en función de la concentración adicionada (%)	89-106

Evaluación de la precisión y análisis de muestras fortificadas: [PAH]=300  $\mu\text{g kg}^{-1}$

### Análisis de muestras

El método se aplicó al análisis de muestras de suelo tomadas en cinco localizaciones dentro de la provincia de Córdoba, tres de ellas en diferentes puntos de la capital (el Campus universitario de Rabanales, un parque y un huerto urbano) y dos de ellas en campos de cultivo localizados en zonas rurales. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de las muestras.

Tabla 2. Concentraciones medias  $\pm$  desviaciones estándar ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) obtenidas para los CPAH en muestras de suelo de la provincia de Córdoba

CPAH	Campus universitario	Campo de cultivo	Huerto urbano	Parque urbano	Campo de cultivo
BaA	11 $\pm$ 1	4,4 $\pm$ 0,6	15 $\pm$ 1	24 $\pm$ 4	1,7 $\pm$ 0,5
Chry	11,2 $\pm$ 0,9	4,2 $\pm$ 0,2	20,4 $\pm$ 0,4	22 $\pm$ 2	4,6 $\pm$ 0,6
BbF	13 $\pm$ 1	10 $\pm$ 2	49 $\pm$ 5	21 $\pm$ 2	7,3 $\pm$ 0,5
BkF	14,7 $\pm$ 0,8	3,4 $\pm$ 0,3	6,7 $\pm$ 0,7	14 $\pm$ 1	1,5 $\pm$ 0,3
BaP	4,7 $\pm$ 0,3	10,3 $\pm$ 0,6	4,19 $\pm$ 0,05	6,8 $\pm$ 0,5	0,75 $\pm$ 0,07
DahA	8,0 $\pm$ 0,8	3,3 $\pm$ 0,3	11,7 $\pm$ 0,6	9,6 $\pm$ 0,7	2,4 $\pm$ 0,5
IcdP	11 $\pm$ 1	2,8 $\pm$ 0,6	28,9 $\pm$ 0,2	21 $\pm$ 1	7,4 $\pm$ 0,5
$\Sigma$ CPAH	73,6	38,4	135,9	118,4	26,0

En las muestras de suelo tomadas en Córdoba capital se encontraron concentraciones de los CPAH superiores a las obtenidas en suelos de zonas

rurales, aunque en ningún caso se superaron los niveles genéricos de referencia establecidos en la legislación española para estos contaminantes (2.000-100.000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en suelos industriales, 200-100.000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en suelos urbanos y 20-20.000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en suelos para otros usos [8]).

En la Figura 3 se incluyen, a modo de ejemplo, los cromatogramas obtenidos para la muestra de suelo del huerto urbano registrando la intensidad de fluorescencia a las diferentes longitudes de onda de excitación y emisión usadas para detectar los CPAH.

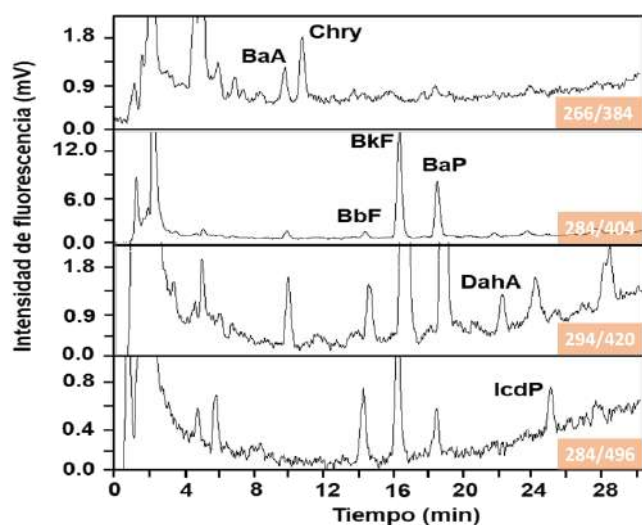


Figura 3. Cromatogramas CL-FLU obtenidos para la muestra de huerto urbano.

## Conclusiones

Los disolventes supramoleculares de ácidos alquilcarboxílicos extraen eficazmente a los CPAH de las muestras de suelo utilizando bajas relaciones volumen de disolvente/cantidad de muestra (1,5  $\mu\text{L mg}^{-1}$ ) y bajos tiempos de extracción (15 min) sin necesidad de utilizar energías auxiliares. La elevada eficacia de extracción de los ACA-SUPRAS se debe a la capacidad de la región no polar de los agregados que los constituyen, formada por las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas de ACA y el THF, para establecer múltiples enlaces CH- $\pi$  con los anillos aromáticos de los CPAH. El uso de condiciones suaves de extracción, junto con la capacidad de los ACA-SUPRAS para actuar como materiales de acceso restringido, proporciona extractos con bajo contenido en materia orgánica, evitando así la necesidad de llevar a cabo etapas adicionales de limpieza. El método de extracción propuesto ha demostrado ser adecuado para la determinación de los CPAH en un amplio rango de concentraciones en suelos con diferente

composición, alcanzando bajos límites de cuantificación sin necesidad de concentrar los extractos, una práctica común en los métodos previamente descritos.

## Referencias

- [1] M. Nishio, The CH/ $\pi$  hydrogen bond in chemistry. Conformation, supramolecules, optical resolution and interactions involving carbohydrates, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 13873–13900, <https://doi.org/10.1039/c1cp20404a>.
- [2] J. Ran, M.W. Wong, Saturated hydrocarbon–benzene complexes: Theoretical study of cooperative CH/ $\pi$  interactions, *J. Phys. Chem. A* 110 (2006) 9702–9709, <https://doi.org/10.1021/jp0555403.s001>.
- [3] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Water-induced coacervation of alkyl carboxylic acid reverse micelles: phenomenon description and potential for the extraction of organic compounds, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473–7484, <https://doi.org/10.1021/ac0708644>.
- [4] H.I. Abdel-Shafy, M.S.M. Mansour, A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation, *Egypt. J. Pet.* 25 (2016) 107–123, <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>.
- [5] Y. Chen, J. Zhang, F. Zhang, X. Liu, M. Zhou, Contamination and health risk assessment of PAHs in farmland soils of the Yinma River Basin, China, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 156 (2018) 383–390, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.020>.
- [6] D. Knopp, M. Seifert, V. Väänänen, R. Niessner, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated water and soil samples by immunological and chromatographic methods, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 2035–2041, <https://doi.org/10.1021/es991215f>.
- [7] Y. Ding, L. Li, F. Wania, Y. Zhang, H. Huang, T. Liao, J. Liu, S. Qi, Formation of non-extractable residues as a potentially dominant process in the fate of PAHs in soil: Insights from a combined field and modeling study on the eastern Tibetan Plateau, *Environ. Pollut.* 267 (2020) 115383, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115383>.
- [8] Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la lista de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y normas para la declaración de suelos contaminados, BOE Núm. 15 (18 de enero de 2005).