

## DESARROLLO DE MÉTODOS NO CONVENCIONALES PARA LA EXTRACCIÓN DE FENANTRENO Y PIRENO EN PARTÍCULAS SEDIMENTADAS

ANDRÉS ESCALONA\*, FEDERICO GALARRÁGA, RAIZA FERNÁNDEZ, ANDREÍNA CENTENO, JOHANY VELÁSQUEZ, GUSTAVO PÉREZ

Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias

\*andres.escalona@ciens.ucv.ve

Recibido: abril 2009

Recibido en forma final revisado: febrero 2012

### RESUMEN

El presente trabajo describe los avances en el desarrollo de métodos no convencionales para el tratamiento de muestras de partículas atmosféricas sedimentadas en túneles ubicados en la ciudad de Caracas, Venezuela, para el estudio de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's). Las técnicas utilizadas fueron Soxhlet (que proporciona la técnica de referencia), la extracción acelerada por solvente (ASE) y la dispersión de la matriz en la fase sólida (MSPD). Los resultados indican que la técnica más favorable fue la MSPD, porque mostró las ventajas de menor tiempo de trabajo y menor consumo de solventes. Los compuestos poliaromáticos fueron separados e identificados por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) con detección por fluorescencia (FLD). Dos PAH's fueron identificados: fenantreno y pireno.

Palabras clave: Extracción de PAH's, MSPD, Partículas sedimentadas, HPLC, ASE

### UNCONVENTIONALS EXTRACTIONS METHODS FOR SAMPLES TREATMENT ON THE SETTLED PARTICLES FOR PHENANTHRENE AND PYRENE

#### ABSTRACT

The present study shows the advances in the developments of extraction procedure of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) in samples from atmospheric settled particles collected in highway tunnels of Caracas city, Venezuela. The techniques used were Soxhlet (as a reference technique), accelerated solvent extractions (ASE) and matrix solid phase dispersion (MSPD). The results indicate that the best technique was MSPD which show advantages such as less time and solvent consumption. The PAH's compounds were identified using high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detector (FLD). Two PAHs were identifying: phenanthrene and pyrene.

Keywords: PAH's extraction, MSPD, Settled particles, HPLC, ASE

#### INTRODUCCIÓN

Los PAH's, son compuestos orgánicos de dos o más anillos aromáticos, en general insolubles en agua, los cuales pueden acumularse en la materia orgánica asociada con partículas y sedimentos presentes en el medio ambiente.

Sus orígenes en el ambiente urbano, provienen de dos fuentes: A) La antropogénica que es producto de

la combustión incompleta de los combustibles fósiles empleados y las emisiones generadas por las industrias, las actividades domésticas, el refinamiento de aceites, entre otras. B) Las provenientes de fuentes naturales, como la quema de biomasa y las emisiones volcánicas (Benner et al. 1989). La incorporación de estas moléculas a las diversas partículas, tanto sedimentadas como las suspendidas, se produce por fenómenos de adsorción de estos compuestos sobre material inorgánico, los cuales presentan mayor área

superficial (Spiro & Stigliani, 1980; Albert, 1990; Valerio & Pala, 1991).

La técnica de extracción Soxhlet, es la normalmente utilizada para el aislamiento de estos compuestos. Esta fue introducida en 1879 (Soxhlet, 1879) y es la técnica tradicional por excelencia. A pesar de su alta eficiencia, es en general lenta y tediosa, con un elevado consumo de solvente y un extenso período de trabajo (12 a 24 h); el producto obtenido de la extracción con Soxhlet, requiere de un proceso de fraccionamiento cromatográfico (purificación), con una columna clásica que contiene sílica gel para la recolección de la fracción de interés, libre de interferentes (Rehwagen et al. 2005). Técnicas de extracción más sofisticadas, como la extracción acelerada con solvente, (ASE), han sido utilizadas para extraer los hidrocarburos aromáticos policíclicos de partículas atmosféricas de la ciudad de Caracas, identificando la presencia de criseno, fenantreno, naftaleno y pireno (Velásquez, 2005). En este caso la muestra es sometida a procesos de alta temperatura y presión, de esta forma se obtienen mejoras importantes en la extracción (Richter et al. 1996).

En el presente trabajo se muestran los avances de un método de extracción, con énfasis en el uso de la técnica de dispersión de la matriz en la fase sólida (MSPD). La técnica de la MSPD fue desarrollada por Barker y Hawley alrededor de los años 90, (citado por Thurman & Mills, 1998), tratando de aislar drogas en tejidos biológicos. En esta técnica se puede utilizar un soporte sólido químicamente modificado, el cual se mezcla mecánicamente con la muestra, produciéndose una ruptura en la arquitectura de la misma, formando una nueva fase mixta, facilitando así el proceso de extracción (Lanças, 2004; Barker, 2007). Lo relevante de la misma es la simplicidad en el trabajo experimental, así como la baja cantidad de solvente usado y un menor tiempo de operación

La MSPD se ha aplicado a diversas matrices para la extracción de los PAH's, como en muestras de miel, reportándose porcentajes de recuperación, entre 80-101% para los hidrocarburos referidos (Albero et al. 2003). La presencia de estos compuestos en pescado ha sido demostrada (Pensado et al. 2005). Así mismo, la extracción de PAH's con la MSPD, ha sido aplicado a suelos (Pena et al. 2007) y en sedimentos (Pena et al. 2008).

Su aplicación en el caso de partículas atmosféricas sedimentadas (polvo), ha sido prácticamente inexistente, salvo por los estudios de extracción de PAH's en partículas de esta misma naturaleza, provenientes de muestras del túnel El Valle, de la ciudad de Caracas (Centeno, 2005).

La información sobre la determinación o caracterización de los PAH's, sobre partículas atmosféricas, es escasa en Venezuela; no obstante, se han reportado en partículas obtenidas en túneles de la ciudad de Caracas, la presencia de hidrocarburos aromáticos del tipo fenantreno y dibenzotiofeno, así como pireno y criseno (Fernández et al. 2000), cuya importancia radica en que muchos de estos compuestos han sido reportados como potenciales o probables compuestos cancerígenos (IARC, 2002).

El objetivo del presente trabajo es mostrar el avance en el desarrollo de algunos métodos de extracción de PAH's en partículas atmosféricas sedimentadas, haciendo énfasis en la técnica de MSPD como procedimiento alternativo a la extracción de compuestos poliaromáticos, en relación con el método de extracción convencional.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Muestras

Las muestras fueron tomadas en los bordes internos de los túneles El Valle y Boquerón I en la ciudad de Caracas; considerando que el muestreo de partículas en túneles proporciona la oportunidad de analizar los compuestos siempre en las mismas condiciones de emisión (Fernández & Galárraga, 2001). Se empleó para su recolección una escoba y una pala plástica, luego éstas fueron almacenadas en bolsas de polietileno y refrigeradas para su posterior tratamiento y análisis.

### Acondicionamiento de las muestras

Las referidas muestras se secaron a temperatura ambiente y se separaron en cuatro fracciones, empleando tamices de acero inoxidable (ASTM). Los rangos de tamaños de partícula expresados en micras ( $\mu\text{m}$ ), fueron: 500-2000; 250-500; 125-250; 63-125 y 45-63. Cada una de estas fracciones fue analizada por HPLC.

### Reactivos y Materiales

Los reactivos empleados fueron: diclorometano, n-heptano y tolueno grado pro-análisis de la casa comercial Sigma-Aldrich. La fase estacionaria, para las separaciones por cromatografía líquido sólido, fue sílica gel de diámetro de poro y rango de diámetro de partícula de: 6nm y 60-200  $\mu\text{m}$ , respectivamente, suministrada por la empresa *Sharlau* GE0049.

En el caso de la MSPD, se usó como solvente C18/ Porasil B con rango de tamaño de partícula de 37-75  $\mu\text{m}$ ,

suministrado por la casa comercial *Waters Associates*. Con el uso de la ASE, se utilizó sulfato de sodio como desecante y los solventes ya señalados. Para el análisis cromatográfico por HPLC se usó acetonitrilo (*Burdick & Jackson*) y agua desionizada, ambos grado cromatográfico. Los patrones de poliaromáticos (el pireno, el criseno, el fenantreno y el fluoranteno), fueron suministrados por *Chem Service*.

## Equipos

Los equipos utilizados en esta investigación fueron: un equipo *Dionex ASE 200* con capacidad para 24 muestras; rango de presión entre 500-3000 psi y una temperatura máxima de operación de 200 ° C. Para el desarrollo del método por la MSPD, se usó un equipo *Visiprep™* and *Visiprep – DT Solid Phase Extractions Vacuum Manifolds*, de la casa comercial *SUPELCO*. Para el análisis de los PAH's se utilizó un Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia *Hewlett Packard* modelo 1100, constituido de los siguientes módulos: degasificador; bomba cuaternaria; automuestreador; compartimiento de la columna; detectores, UV de arreglo de diodo y de fluorescencia; estación de trabajo chem station versión 1997. El agua grado cromatográfico de 18 MΩ de conductividad, fue obtenida por un sistema *NanoPure*, marca *Barnstead*.

## Métodos y condiciones de trabajo

En todos los casos, a excepción del método desarrollado por la técnica de la MSPD, se ejecutó un procedimiento gravimétrico que consistió en extraer las fracciones de hidrocarburos saturados y aromáticos de las muestras en estudio; eliminando los solventes por evaporación y llevando hasta peso constante el producto obtenido en cada extracción; determinando así los porcentajes en peso de cada familia de compuestos.

## Procedimientos

Extracción por la técnica de Soxhlet

La extracción se realizó con diclorometano. Una masa de 5 g de muestra se colocó en contacto con 100 mL de diclorometano, durante 12 h, una fracción del producto de esta extracción es diluida a través de una columna de sílica gel previamente activada a 120° C, que al ser tratada primero con n-heptano, permite la separación de la fracción de compuestos saturados, mientras que los aromáticos son extraídos con tolueno, esta última fracción es evaporada a sequedad y reconstituida en acetonitrilo para su análisis por cromatografía de líquidos.

Extracción por la técnica de ASE

Se optimizaron las condiciones a través de un diseño experimental usando como variables experimentales la temperatura, el tiempo de extracción estático, el número de ciclos y el tipo de solvente. Las condiciones óptimas de extracción fueron: temperatura de la celda 150 °C, presión 1500 psi.; tiempo de extracción 5 min y el número de ciclos de 4. Para la obtención de las familias de compuestos saturados y aromáticos, se procedió idénticamente al caso anterior.

Extracción por la técnica de la MSPD

Se realizó un diseño de experimentos 2 k-1 para optimizar los tiempos de extracción de las familias de compuestos, los volúmenes de extracción y la proporción de muestra/solvente, resultando los tiempos de extracción para cada familia de compuestos (saturados y aromáticos) de 2 min y los volúmenes de 8 y 1,5 mL, para el n-heptano y el tolueno, respectivamente; la proporción muestra/solvente óptima resultó de 1:4. En el dispositivo de extracción de la MSPD (jeringa) se colocaron 400 mg de muestra, y debajo de éste se instaló un cartucho comercial con fase C18, para efectos de purificación de las fracciones (clean-up).

Análisis por HPLC

Se utilizó una columna *Supelcosil LC-8-DB* de diámetro interno y longitud de 4,6 y 150 mm, respectivamente, y diámetro de partícula de 3 µm, con fase móvil de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O: 50/50 V/V a un flujo de 1 mL/min, volumen de inyección de 20 µL y una temperatura de la columna de 30°C. La detección por UV se realizó a 254 nm, en tanto que la de fluorescencia a 240 nm y 410 nm de excitación y emisión, respectivamente; una vez identificados los compuestos se programaron en sus máximos de sensibilidad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Comparación entre las técnicas de Soxhlet y ASE

Los resultados obtenidos son presentados en la Tabla 1 para las diferentes fracciones granulométricas. Se observa que las proporciones en peso del extracto total de la fracción orgánica (FOT), son similares para cada tamaño de partícula, tanto en la extracción por Soxhlet (4-7%) como por ASE (4-10%). Se aprecia que en la medida de que el rango de tamaño de partícula disminuye, menor es la cantidad de materia orgánica presente.

En la Tabla 2, se presentan los resultados de la extracción de los hidrocarburos aromáticos. Los valores obtenidos por ambas técnicas están en el mismo orden de magnitud, entre 0,1 y 0,2 % y se aprecia la tendencia de estos hidrocarburos

a concentrarse en las partículas de menor tamaño.

**Tabla 1.** FOT obtenida con Soxhlet y con ASE

Tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ )	% FOT Soxhlet *	% FOT ASE *
63-125	4,2 $\pm$ 0,2	4,4 $\pm$ 0,2
125-250	4,6 $\pm$ 0,2	4,7 $\pm$ 0,2
250-500	7,2 $\pm$ 0,1	8,1 $\pm$ 0,1
500-2000	7,4 $\pm$ 0,1	9,6 $\pm$ 0,2

FOT: Fracción orgánica total \*Porcentaje en peso, promedio de dos replicas.

**Tabla 2.** Compuestos aromáticos obtenidos con Soxhlet y ASE

Tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ )	% Aromáticos Soxhlet *	% Aromáticos ASE *
63-125	0,17 $\pm$ 0,06	0,23 $\pm$ 0,05
125-250	0,16 $\pm$ 0,09	0,24 $\pm$ 0,05
250-500	0,11 $\pm$ 0,09	0,16 $\pm$ 0,03
500-2000	0,11 $\pm$ 0,06	0,10 $\pm$ 0,04

\* Porcentaje en peso, promedio de dos réplicas.

### Comparación entre las técnicas de Soxhlet y MSPD

Es importante recordar que con el uso de la técnica de extracción MSPD, se mezcla la muestra con el solvente y se hacen pasar por esta fase mixta los solventes que extraen los compuestos de interés.

La Tabla 3 muestra las concentraciones obtenidas para los hidrocarburos aromáticos (expresadas en porcentaje en peso) y para los diferentes rangos de tamaño de partícula. La técnica MSPD permite extraer un porcentaje mayor en peso (0,4-1,8) de estos compuestos en comparación con los resultados obtenidos por Soxhlet (0,3-0,8).

Similarmente como en la Tabla 2, se observa que a medida de que disminuye el tamaño de las partículas, se obtiene mayor proporción en peso de los compuestos aromáticos, atribuido a la facilidad de adsorción de estos compuestos sobre las partículas que presentan mayor área superficial (Spiro & Stigliani, 1980; Albert, 1990; Valerio & Pala, 1991). Considerando que los compuestos aromáticos se concentran en las partículas de menor tamaño, lo recomendable hubiese sido seleccionar el rango correspondiente a la fracción entre 45 y 63  $\mu\text{m}$ , para los posteriores estudios. Sin embargo, debido a que la cantidad de muestra correspondiente a esta fracción era insuficiente para realizar las réplicas requeridas para la evaluación del

método, fue necesario trabajar con la fracción de 63-125  $\mu\text{m}$ .

**Tabla 3.** Compuestos aromáticos obtenidos con Soxhlet y MSPD

Tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ )	% Aromáticos Soxhlet*	% Aromáticos MSPD*
45- 63	0,82 $\pm$ 0,01	1,80 $\pm$ 0,03
63-125	0,69 $\pm$ 0,02	1,27 $\pm$ 0,02
125-250	0,48 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,06
500-2000	0,35 $\pm$ 0,06	0,42 $\pm$ 0,03

\* Promedio de dos replicas.

### Comparación de las variables operacionales

En las Tablas 4 y 5 se aprecian las diferentes variables estudiadas que permiten comparar las técnicas de extracción evaluadas en esta investigación.

En la Tabla 4, se comparan las variables operativas para la ejecución de los métodos Soxhlet y ASE (para una misma cantidad de muestra). Los resultados indican que el volumen de diclorometano usado con la técnica ASE es alrededor de 3 veces menor. Adicionalmente el tiempo de extracción (t. extr) es de 30 min, inferior al empleado con el método Soxhlet, es decir de 12 horas.

Para la separación en las familias de compuestos saturados y aromáticos, los volúmenes de reactivos empleados fueron equivalentes, 50 mL de n-heptano (saturados) y 150 mL de tolueno (aromáticos). Por su parte el tiempo de fraccionamiento (t. fracc) correspondió a 12 h, en ambas técnicas.

En la Tabla 5, se presentan a modo comparativo las variables estudiadas anteriormente, en este caso para las técnicas de Soxhlet y MSPD, en esta última se observa que la cantidad de muestra es reducida en un factor de 10, no se requiere el uso de diclorometano para extraer la fracción orgánica y los volúmenes utilizados para extraer las fracciones de saturados y aromáticos son pequeños (en un factor alrededor de 6 para el n-heptano y al menos 66 veces inferior para el tolueno), respecto al método de referencia (Soxhlet). Esta diferencia pudiese estar asociada con la menor cantidad de muestra empleada en la MSPD.

En cuanto a los tiempos de operación, los valores más bajos corresponden a la MSPD (0,25 h) comparado con Soxhlet (12 h). En ambos casos esta diferencia se debe a la menor cantidad de muestra utilizada en la MSPD.

En resumen para la metodología MSPD, el proceso de extracción y el procedimiento de fraccionamiento de los analitos se realizan en un solo paso, lo que permite reducir significativamente tanto el tiempo de operación como el consumo de solventes. En general, el tiempo de extracción así como las cantidades de solventes utilizados en las técnicas alternativas, son menores a los usados en la técnica clásica (Soxhlet).

**Tabla 4.** Aspectos comparativos de las técnicas Soxhlet y ASE

Técnica	Peso Muestra (g)	V. DCM (mL)	V. HEP (mL)	V. TOL (mL)	t. extr (h)	t. fracc (h)
Soxhlet	5,0000	100	50	150	12	12
ASE	5,0000	35	50	150	0,5	12

Tamaño de partícula seleccionado: 63-125 $\mu$ m.

**Tabla 5.** Aspectos comparativos de las técnicas Soxhlet y MSPD.

Técnica	Peso Muestra (g)	V. DCM (mL)	V. HEP (mL)	V. TOL (mL)	t. extr (h)	t. fracc (h)
Soxhlet	5,0000	100	50,0	100,0	12	12
MSPD	0,5000	-	8,0	1,5	<0,25	<0,25

Tamaño de partícula seleccionado: 63-125 $\mu$ m

DCM: diclorometano HEP: heptano TOL: tolueno

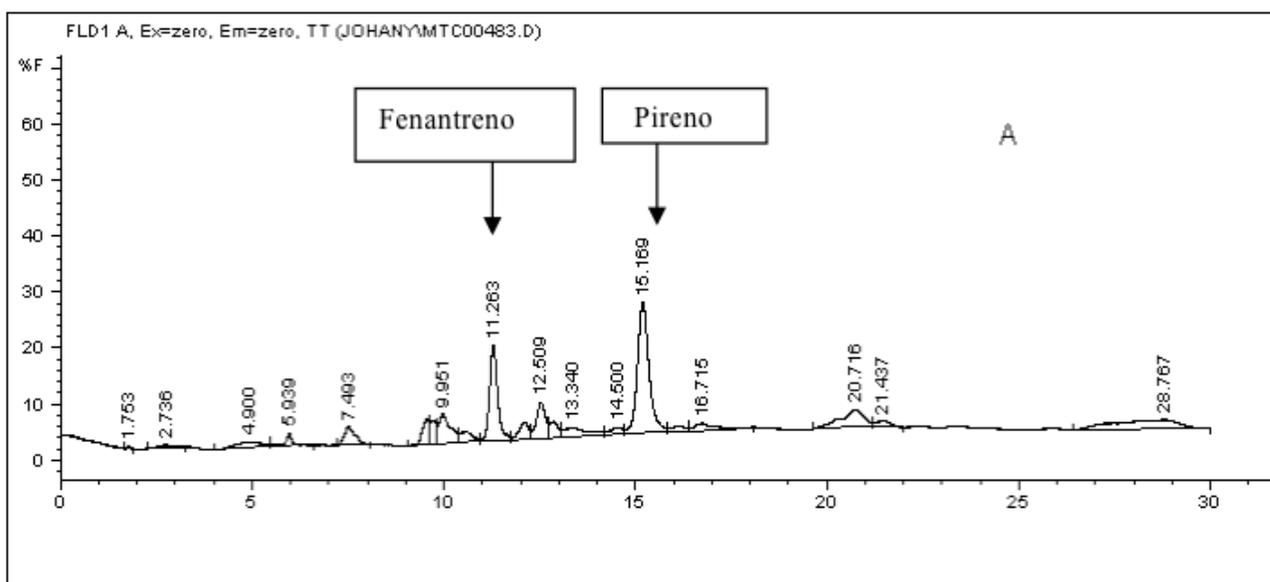
## Identificación de los compuestos PAH y comparación de cromatogramas

Las Figuras 1A y 1B muestran los cromatogramas obtenidos por HPLC con detección por fluorescencia (FLD). La Figura 1A corresponde al extracto obtenido mediante la técnica Soxhlet y la 1B corresponde por su parte a la obtenida con ASE.

Para ambos procedimientos de extracción los PAH's detectados fueron fenantreno y pireno, con tiempos de retención de 11,26 min y 15,18, respectivamente, en concordancia con lo reportado en la literatura (Fernández et al. 2000). En términos generales se puede apreciar que los perfiles cromatográficos obtenidos son muy similares, por lo que ambas técnicas tienen respuestas cromatográficas análogas para este tipo de compuestos.

La presencia de señales adicionales a diferentes tiempos de retención, podría sugerir la presencia de otros PAH's, no identificados, por carecer de los estándares certificados requeridos.

Los resultados presentados en la Figura 2, parte A (Soxhlet) y parte B (MSPD), obtenidos por HPLC-FLD, muestran que los cromatogramas son cualitativamente comparables, indicando que ambas técnicas de extracción permiten la identificación de los mismos compuestos. En términos de la intensidad de las señales es importante indicar que en el caso de la MSPD, la cantidad de muestra es 10 veces menor que la usada con Soxhlet, lo que probablemente influye en la relación señal /ruido en los cromatogramas obtenidos (Centeno et al. 2005).



**Figura 1A.** Cromatograma de fracción extraída por Soxhlet. *t*R (min) Fenantreno: 11.26 Pireno: 15.17

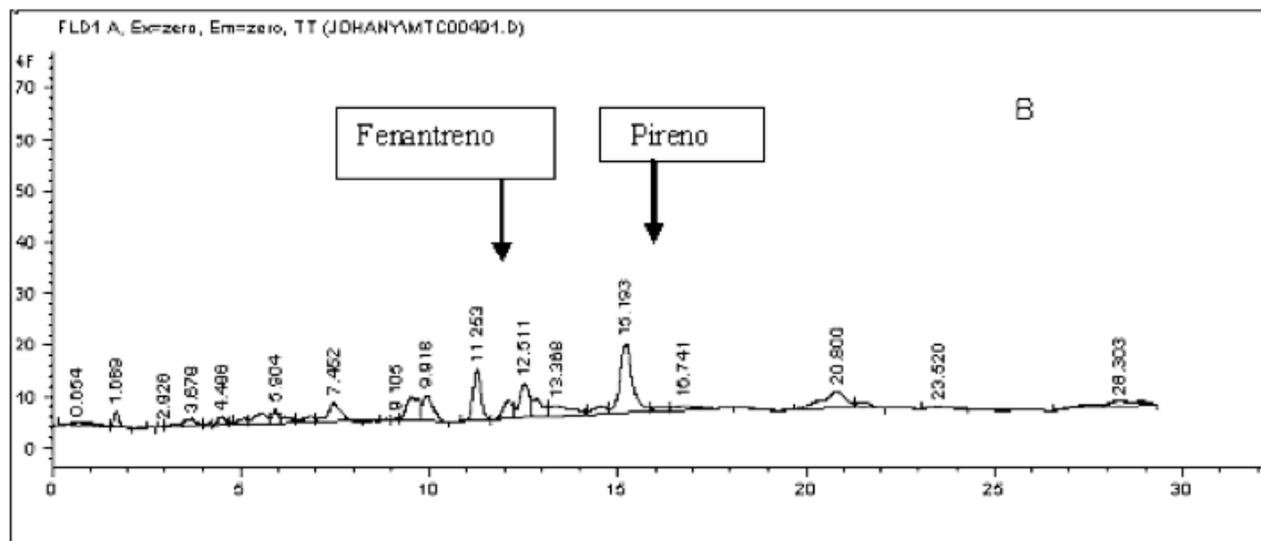


Figura 1B. Cronograma de fracción exgtraída por ASE.  $t_r$  (min) Fenantreno 11.25 Pireno 15.19

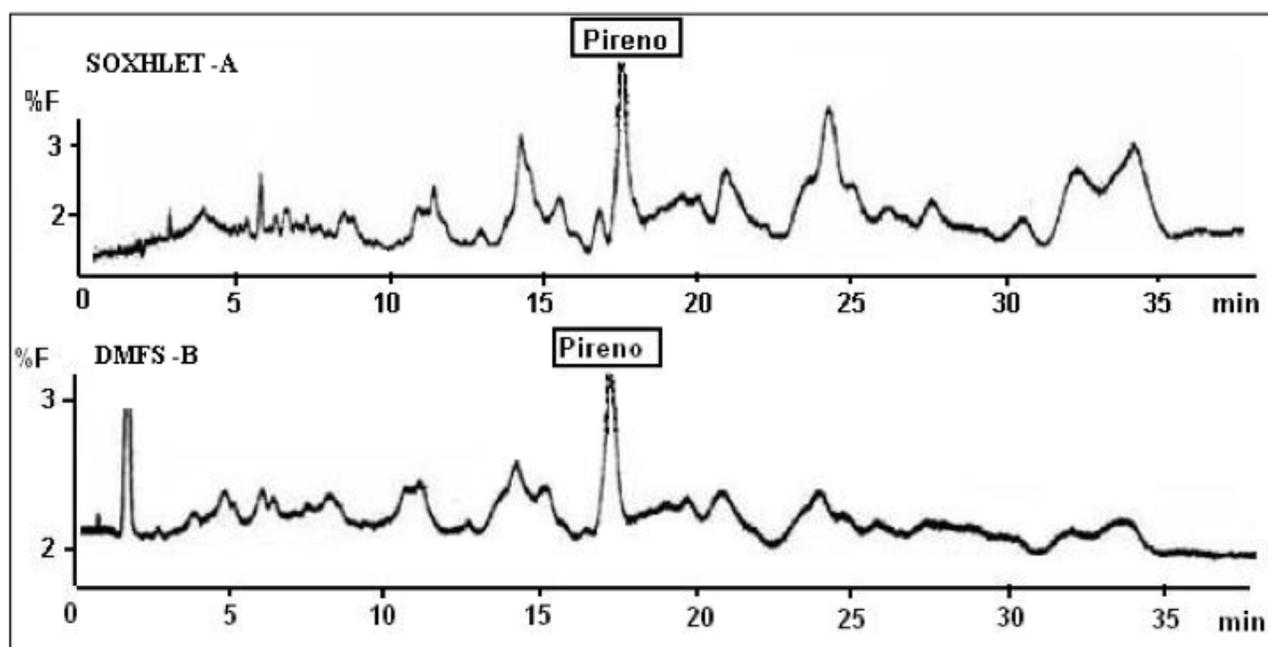


Figura 2. Cromatogramas de la fracción de tamaño de partícula, 63-125  $\mu\text{m}$ . A: Soxhlet, B: MSPD

### Precisión en MSPD

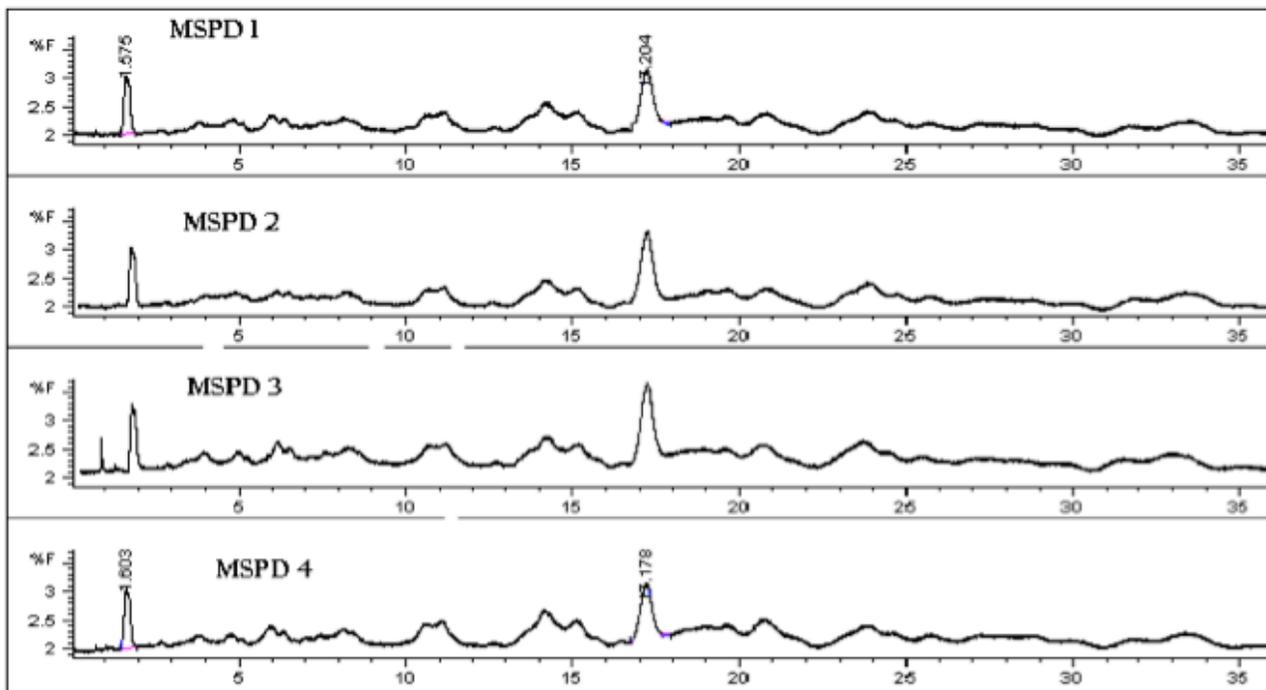
Considerando que la técnica de la MSPD, requiere de cortos tiempos de preparación y manipulación de la muestra, se procedió a realizar un ensayo de repetibilidad, bajo las condiciones de operación óptimas, preparando 4 cartuchos, separadamente y realizando el proceso ya explicado en la sección de: procedimientos de extracción por la técnica MSPD. Los cromatogramas resultantes de 4 réplicas, son presentados en la Figura 3 (Centeno et al. 2006). Se aprecia la reproducibilidad de los cromatogramas obtenidos en cada proceso de extracción por MSPD. El tiempo de retención obtenido para el pireno fue de  $17,17 \pm 0,08$  min,

que corresponde a 0,5 % de desviación relativa. La altura y área de los picos genera una desviación relativa del 5,7%.

### CONCLUSIONES

El método en desarrollo, a través de la técnica de la MSPD, permite realizar en un sólo paso el proceso de extracción y fraccionamiento de los hidrocarburos aromáticos, a presión y temperatura ambiente.

El consumo de solventes puede ser hasta 66 veces menor, para cantidades de muestra en el orden de miligramos a décimas de gramo.



**Figura 3.** Reproducibilidad de la técnica de MSPD. Pireno,  $t_R$ : 17,20 min. Tamaño partícula 63-125 $\mu$ m

Todo el proceso (extracción y fraccionamiento) se realiza en 15 minutos, en comparación con las 36 horas del procedimiento convencional, lo que la perfila como un método rápido (screening), para este tipo de muestras, por su eficiencia y bajo consumo de reactivos.

En las muestras estudiadas fueron identificados pireno y fenantreno.

#### AGRADECIMIENTOS

Al CDCH de la UCV por su apoyo financiero a través de los proyectos: PG: 03-12-4532-2004; PI: 03-00-6050-2005, PI 03.00.6054.2005 y PI 037112 2008. A PDVSA-INTEVEP, Dpto. de Ecología y Ambiente. Dra. Marínela Arias y su equipo de trabajo, por toda la ayuda prestada en el desarrollo de este trabajo.

#### REFERENCIAS

ALBERO, B., SÁNCHEZ, C., TADEO, J. (2003). Determination of organophosphorus pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, pp. 6915-6921.

ALBERT, L. (1990). Manual de toxicología. Editorial Limusa-Noriega. Mexico p. 311.

BARKER, S.A. (2007). Matrix solid phase dispersion. *Journal of biochemical and biophysical methods*. 70, pp. 151-162.

BENNER J.R., BRUCE. A., GORDEN, G., WISE, S. (1989). Mobile sources of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: a roadway tunnel study. *Environmental Science Technology* 23, pp.1269-78.

CENTENO, A. (2005). Estudios de las técnicas de la MSPD y soxhlet para la extracción y determinación de PAH's en particulado atmosférico en el túnel el valle analizado por HPLC/UV,FLD. Trabajo especial de grado de Licenciatura en Química, UCV, Caracas, Venezuela, pp. 62-86.

CENTENO, A., ESCALONA, A., GALÁRRAGA, F. (2005). Estudios de las técnicas MSPD y soxhlet para la extracción y determinación de PAH's en particulado atmosférico en el túnel El Valle analizado por HPLC/UV, FLD. Memorias del VII Congreso Venezolano de Química. (ULA) p. 311.

CENTENO, A., ESCALONA, A., GALÁRRAGA, F., FERNÁNDEZ, R., PÉREZ, G. (2006). Ensayos preeliminares con la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) para el análisis y la determinación de PAH's en partículas sedimentadas de la ciudad de Caracas. Memorias XI COLACRO, Mérida, Yucatán, México. p. 110.

FERNÁNDEZ, R. & GALÁRRAGA, F. (2001). Lead concentration and composition of organic compounds in settled particles in road tunnels from the Caracas Valley-Venezuela. *Environmental Geochemistry and Health* 23, pp. 17-25.

- FERNÁNDEZ, R., GALÁRRAGA, F., BENZO, Z., SALAS, J. (2000) Determinación de compuestos orgánicos (saturados y poliaromáticos) y organosulfurados en partículas depositadas en túneles del área metropolitana de Caracas, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química*, Vol. 23, nº 4, pp. 3-6.
- IARC-International Agency for Research on Cancer. (2002). Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, WHO, Geneva, ISBN 928321532X vol. 82, p. 367.
- LANÇAS, F. M. (2004). *Extração em fase sólida* (SPE), Editorial RIMA, Sao Carlos, Brasil. pp. 53-55.
- PENA, M.T., CASAIS, M.C., MEJUTA, M.C., CELA, R. (2007). Optimization of the matrix solid-phase dispersion sample preparation procedure for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: Comparison with microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A.*, 1165, pp. 32-38.
- PENA, M.T., CASAIS, M.C., MEJUTA, M.C., CELA, R. (2008). Development of a matrix solid-phase dispersion method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge samples. *Analytica Chimica Acta.* 626, 2, pp.155-165.
- PENSADO, L., CASAIS, M. C., MEJUTO, M.C., CELA, R. (2005). Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. *Journal of Chromatography A.* 1077, pp. 103-109.
- REHWAGEN, M., MULLER, A., MASSOLO, L., HERBARTH, O., RONCO, A. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial areas. *Science of the Total Environment*, 348, pp. 199-210.
- RICHTER, B.E., JONES, B. A., EZZEL, J. L., PORTER, N. L., AVDALOVIC, N., POHL, C. (1996). Accelerated Solvent Extraction: A Technique for sample preparation. *Anal. Chem.* 68, 6, pp. 1033-1039.
- SOXHLET, F. (1879). Die gewichtsanalytische bestimmung des Milchefettes, *Polytechnisches J. (Dingler's)* 232,46.
- SPIRO, T. & STIGLIANI, W. (1980). *Environmental issues in chemical perspective*. State University of New York press, p. 374.
- THURMAN, E. M. & MILLS, M.S. (1998). *Solid Phase Extraction*. Vol 147. Jhon Wiley & Sons, INC. USA, p. 309.
- VALERIO, F. & PALA, M. (1991). Effects of temperature on the concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) adsorbed onto airborne particles. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry.* 339, pp. 777-779.
- VELÁSQUEZ, J. (2005). Comparación de técnicas de extracción: Soxhlet y acelerada con solvente de hidrocarburos aromáticos policíclicos en particulado atmosférico depositado en túneles del área metropolitana de Caracas y su análisis por HPLC-UV Y FLD. Trabajo especial de grado de Licenciatura en Química, UCV. Caracas, pp.70-85.