



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Facultade de Ciencias

Grao en Química

Memoria del Trabajo de Fin de Grao

**Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos
(HAP) en musgos**

**Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos
(HAP) en musgos**

**Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons
(PAH) in moss**

Lucía do Chamorro Rodríguez Fornos

Curso: 2020 – 2021

Convocatoria: Febrero

Directoras: Purificación López Mahía
Soledad Muniategui Lorenzo

AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar este trabajo de fin de grado a mis padres, que gracias a su apoyo, dedicación y confianza me han ayudado siempre a salir adelante y darme la oportunidad de poder estudiar.

A mi hermano que, aunque nos llevemos la contraria muchas veces, siempre serás un orgullo para mí.

A mi tía y abuelos, que tanto me protegen y ayudan en cualquier momento.

A mis tutoras por sus orientaciones para la elaboración del trabajo y a Puri, por toda su paciencia, consejos académicos y por ser mi guía.

Gracias a todos.

ÍNDICE

Acrónimos y Abreviaturas	i
Resumen/Resumo/Summary	1
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Contaminación atmosférica	4
1.2. Hidrocarburos aromáticos policíclicos	9
1.3. Los musgos como bioindicadores de la calidad del aire	14
1.4. Procedimientos analíticos para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en musgos	23
2. OBJETIVO	33
3. METODOLOGÍA	33
4. DISCUSIÓN	34
4.1. Los musgos como biomonitores de la calidad del aire	34
4.2. Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en musgos	41
5. CONCLUSIONES/CONCLUSIÓN/CONCLUSIONS	51
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
7. ANEXO I. Cronograma	64

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

Ace: Acenafteno	ISO: Organización Internacional de Normalización
ACE:HEX: acetona/ hexano	MAE: <i>Microwave Assisted Extraction</i>
ACN: Acetonitrilo	MeOH: Metanol
ADN: Ácido desoxirribonucleico	MS: <i>Mass Spectrometry</i>
AECOSAN: Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición	MSPD: <i>Matrix solid phase dispersion</i>
Ant: Antraceno	Naph: Naftaleno
Acy: Acenaftileno	OFM: Oxidasa de función mixta
BaA: Benzo[a]antraceno	OMS: Organización mundial de la salud
BbF: Benzo[b]fluoranteno	Phe: Fenantreno
BkF: Benzo[k]fluoranteno	PID: <i>Photo Ionization Detector</i>
BaP: Benzo[a]pireno	PM: <i>Particulate Matter</i>
BhgiP: Benzo[g,h,i]perileno	PSE: <i>Pressurized Solvent Extraction</i>
CEC: <i>Cationic Exchange Capacity</i>	Pyr: Pireno
Chry: Criseno	SD: Desviación estándar
CORDIS: <i>Community Research and Development Information Service</i>	UNE: Una Norma Española
COP: Compuestos orgánicos persistentes	WHO: <i>World Health Organization</i>
DBahA: Dibenzo[a,h]antraceno	
DCM: Diclorometano	
DE: Dietil éter	
EPA: <i>Environmental Protection Agency</i>	
FAR: Factor de acumulación relativa	
FID: <i>Flame Ionization Detection</i>	
Fl: Fluoreno	
Ft: Fluoranteno	
GC: Gas Chromatography	
HEX: Hexano	
IP: Indeno[1,2,3-c,d]pireno	
HAP: Hidrocarburos aromáticos policíclicos	
HPLC: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>	

RESUMEN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son un grupo de compuestos considerados contaminantes prioritarios debido a su toxicidad, persistencia y bioacumulación, clasificándose también en el grupo de los denominados compuestos orgánicos persistentes (COP). Presentan propiedades mutagénicas, cancerígenas y teratogénicas en los seres vivos, por lo que deben ser controlados.

En los estudios de vigilancia de la calidad del aire, el uso de bioindicadores (empleo de organismos vivos, como los musgos, para evaluar el impacto de un determinado contaminante) es ampliamente utilizado. Estos sistemas requieren un cierto tiempo de exposición y, por lo tanto, no permiten una monitorización en tiempo real, sin embargo, son muy utilizados para una evaluación preliminar o para la biomonitorización de grandes áreas ya que aportan mucha información con un bajo coste, en comparación con los métodos físico-químicos de referencia indicados en la normativa.

En este trabajo fin de grado se hace una introducción acerca del interés del uso de musgos como bioindicadores y los protocolos de trabajo para evaluar la calidad del aire, seguido de una revisión bibliográfica y posterior discusión crítica de las principales aplicaciones así como de los diferentes procedimientos analíticos empleados para la determinación de los HAP en las muestras de musgo que incluye pretratamiento de la muestra, extracción y purificación posterior del extracto obtenido y determinación cromatográfica para su identificación y cuantificación.

RESUMO

Os hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son un grupo de compostos considerados contaminantes prioritarios debido á súa toxicidade, persistencia e bioacumulación, clasificándose tamén no grupo dos denominados compostos orgánicos persistentes (COP). Presentan propiedades mutagénicas, canceríxenas e teratogénicas nos seres vivos, polo que deben ser controlados.

Nos estudos de vixilancia da calidade do aire, o uso de bioindicadores (emprego de organismos vivos, como os musgos, para avaliar o impacto dun determinado contaminante) é amplamente utilizado. Estes sistemas requiren un certo tempo de exposición e, por tanto, non permiten unha monitoraxe en tempo real, con todo, son moi utilizados para unha avaliación preliminar ou para a biomonitorización de grandes áreas xa que achegan moita información cun baixo custo, en comparación cos métodos físico-químicos de referencia indicados na normativa. Neste traballo fin de grao faise unha introdución achega do interese do uso de musgos como bioindicadores e os protocolos de traballo para avaliar a calidade do aire, seguido dunha revisión bibliográfica e posterior discusión crítica das principais aplicacións así como dos diferentes procedementos analíticos empregados para a determinación dos HAP nas mostras de musgo que inclúe pretratamiento da mostra, extracción e purificación posterior do extracto obtido e determinación cromatográfica para a súa identificación e cuantificación. .

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are a group of compounds considered priority pollutants due to their toxicity, persistence and bioaccumulation, also being classified in the group of so-called persistent organic compounds (POPs). They present mutagenic, carcinogenic and teratogenic properties in living beings, so they must be controlled.

In air quality surveillance studies, the use of bioindicators (use of living organisms, such as mosses, to assess the impact of a certain pollutant) is widely applied. These systems require a certain exposure time and, therefore, do not allow real-time monitoring; however, they are widely used for a preliminary evaluation or for biomonitoring of large areas since they provide a lot of information at a low cost, in comparison with the reference physicochemical methods indicated in the regulations.

In this final degree project, an introduction is presented about the interest in the use of mosses as bioindicators and the work protocols to assess air quality, followed by a bibliographic review and subsequent critical discussion of the main applications, as well as the different analytical procedures used for the determination of PAH in moss samples: These procedures included sample pretreatment, extraction and subsequent purification of the obtained extract and chromatographic determination for its identification and quantification.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA

El crecimiento económico y la globalización han originado innumerables ventajas a lo largo de todos estos años, sin embargo, también han provocado la aparición o agravamiento de riesgos para la salud humana debido a la contaminación atmosférica. Esto es debido a que el continuo desarrollo industrial, el uso de los automóviles y la escasa vigilancia política de control ambiental ha dado lugar a un importante problema medioambiental que tenemos hoy en día. Actualmente, los efectos de numerosos episodios de contaminación, la instauración de la educación ambiental y un mayor interés de la clase política, han conseguido una mayor concienciación social y compromiso a la solución de esta problemática a nivel mundial.

Son numerosos los estudios epidemiológicos que indican que la calidad del aire influye en la salud, y son las emisiones perjudiciales, procedentes de numerosas fuentes naturales o antropogénicas, las que contaminan la atmósfera, reduciendo la calidad de vida, dando lugar a enfermedades respiratorias y cardiovasculares.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la contaminación atmosférica es la presencia en la atmósfera de una o varias sustancias extrañas, en determinadas cantidades y durante determinados periodos de tiempo que puedan resultar nocivas para el ser humano, los animales, las plantas o suelos, así como perturbar el bienestar o el uso de los bienes. Hoy en día, se encuentran identificadas alrededor de 3000 sustancias gaseosas consideradas como contaminantes atmosféricos, además de la materia particulada atmosférica en suspensión en el aire y los compuestos tóxicos que formen parte de ella.

Los contaminantes se clasifican atendiendo a diferentes criterios tal y como se indican en la tabla 1. La contaminación atmosférica comienza con la emisión de gases a la atmósfera (Calvo *et al.*, 2016) Si los contaminantes son primarios, pueden proceder de fuentes móviles (aviación, transporte o navegación) o fuentes fijas (industria). El control de emisiones de las fuentes móviles es muy complejo ya que éstos no tienen localización geográfica concreta, al contrario de las fuentes fijas, en las que se puede cuantificar los niveles de contaminación que emite. Una vez introducidos en la atmósfera, los contaminantes pueden ser transportados por el viento, dispersados o transformados en otras especies químicas. La concentración atmosférica final de todos estos procesos se conoce como nivel de inmisión, y si estos niveles no son adecuados, disminuye la calidad del aire y se originan los efectos nocivos sobre diversos receptores: el ser humano, animales, plantas y ecosistemas en su conjunto (figura 1).

Tabla 1. Fuentes de contaminación (Calvo *et al.* 2016).

Según origen		Forma de emisión	
Origen natural Emisiones procedentes de actividad natural de la geosfera, biosfera, atmósfera e hidrosfera	Origen antropogénico Emisiones procedentes de la actividad humana	Primarios Emitidas a la atmósfera directamente	Secundarios Se originan a partir de los primarios por reacciones químicas que tienen lugar en la atmósfera
Ejemplos			
Erupciones volcánicas, incendios forestales, actividad biológica, descargas eléctricas	Hogar, transporte, industria, agricultura y ganadería, eliminación de residuos sólidos, incineración	Partículas, compuestos de azufre, de nitrógeno y carbono, compuestos orgánicos, compuestos halogenados, metales pesados	Oxidantes fotoquímicos, SO ₃ , NO ₂ , H ₂ SO ₄ , HNO ₃
Según Reactividad		Según estado físico	
Reactivos: Ionizan átomos/moléculas directamente, alterando el equilibrio químico de su estructura y sus funciones.	Inertes: Pueden transformarse en reactivos mediante reacciones con la luz u otros compuestos	Gaseoso: en su gran mayoría Sólidos: Polvo en suspensión, conocido como material particulado Líquido: Gotas de agua con las sustancias disueltas en ella	

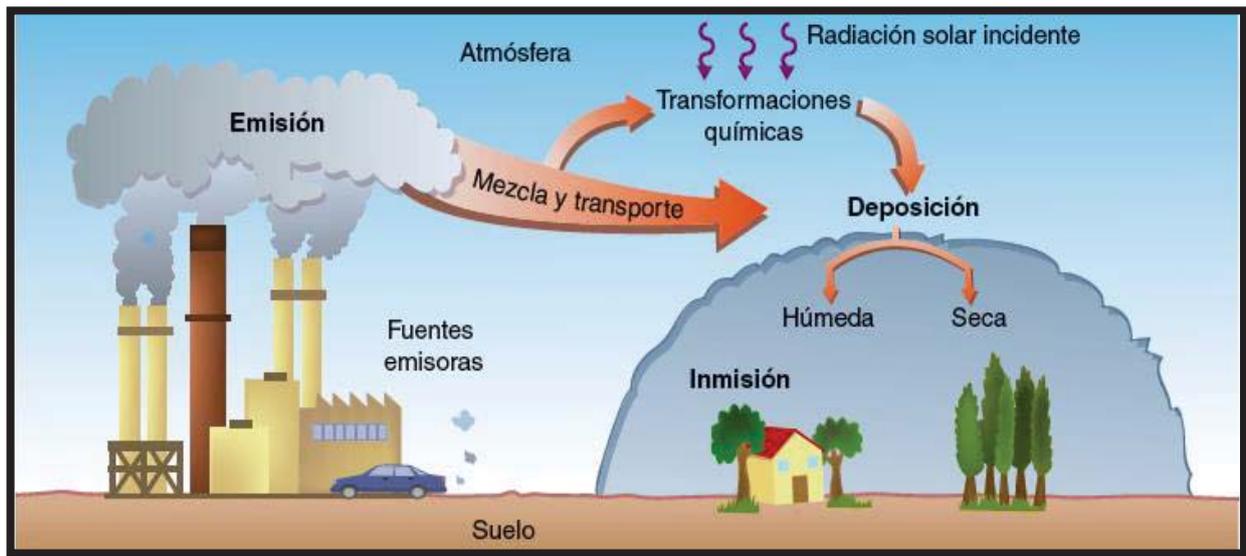


Figura 1. Proceso contaminación atmosférica (Calvo *et al.* 2016).

Los efectos nocivos se producen por la inhalación del aire contaminado y por el fenómeno llamado deposición atmosférica, donde los contaminantes son transportados a la superficie. Mediante la deposición húmeda, los contaminantes se incorporan al agua de lluvia, niebla o nieve por disolución, conocido como *rain-out*, o se incorporan a las precipitaciones, por arrastre, al atravesar una masa de aire contaminado, conocido como *wash-out* (Ávila y Aguiillaume *et al.* 2017).

Mediante la deposición seca los contaminantes llegan a la superficie mediante impacto, sedimentación o difusión. Generalmente la deposición seca ocurre en tres etapas: en la primera, los contaminantes son transportados hasta la capa de aire justo en contacto con la superficie, determinada por los procesos atmosféricos y transporte turbulento; a continuación, se produce el transporte gobernado por fenómenos de difusión dentro de la capa quasi-laminar, donde finalmente interaccionan con la superficie.

En la tabla 2 se indica las características de los contaminantes primarios y sus efectos en los seres vivos, plantas y materiales. Los distintos efectos, que se dividen en efectos locales (ocasionados directamente por los contaminantes), efectos regionales (que afectan a una región, como la lluvia ácida) o efectos globales (que afecta a nivel global como el cambio climático), vienen determinados por la clase de contaminantes, concentración y tiempo de exposición, además de la sensibilidad de los receptores como las posibles reacciones entre contaminantes.

La legislación española sobre calidad del aire en vigor viene representada por las siguientes normas:

- **Ley 34/2007, de 15 de noviembre**, de calidad del aire y protección de la atmósfera. Es la base legal para los desarrollos relacionados con la evaluación y la gestión de la calidad del aire en España, y tiene como fin último el de alcanzar unos niveles óptimos de calidad del aire para evitar, prevenir o reducir riesgos o efectos negativos sobre la salud humana, el medio ambiente y demás bienes de cualquier naturaleza.
- **Real Decreto 102/2011, de 28 de enero**, relativo a la mejora de la calidad del aire, norma que transpone al ordenamiento jurídico español el contenido de la **Directiva 2008/50/CE** y la **Directiva 2004/107/CE**. Se aprueba con la finalidad de evitar, prevenir y reducir los efectos nocivos de las sustancias mencionadas sobre la salud humana, el medio ambiente en su conjunto y demás bienes de cualquier naturaleza. Real Decreto que fue modificado por el **Real Decreto 39/2017**, para transponer a nuestro ordenamiento jurídico la **Directiva 2015/1480**, que establece normas relativas a los métodos de referencia, validación de datos y ubicación de los puntos de medición para la evaluación de la calidad del aire ambiente, e incorporar los nuevos requisitos de intercambio de información establecidos en la Decisión 2011/850/UE.

Tabla 2. Características y efectos de los principales contaminantes atmosféricos (continúa).

CONTAMINANTE	CARACTERÍSTICAS	ORIGEN	EVOLUCIÓN EN LA ATMÓSFERA	PRINCIPALES EFECTOS		
				SER HUMANO/ ANIMALES	VEGETALES	MATERIALES
Compuestos de azufre						
Óxidos de azufre	Gases incoloros El SO ₂ : corrosivo, estable y olor picante El SO ₃ : muy reactivo	Erupciones volcánicas Oxidación del azufre El SO ₂ (oxidación del H ₂ S).	Reacción con el H ₂ O (ácido sulfúrico) El SO ₂ (12h-6días) Depósito en suelos o	El SO ₂ : irritación ojos y mucosas El H ₂ S produce malos olores	El SO ₂ produce clorosis y necrosis Reduce crecimiento y rendimiento de los vegetales	Metal (corrosión) Papel (color amarillento) Caliza (provoca su descomposición)
		Erupciones volcánicas Refinerías de petróleo Degradación anaeróbica de la materia orgánica	Oxidación fotoquímica a SO ₂			
Sulfuro de hidrógeno	Gas incoloro con fuerte olor desagradable					
Compuestos de nitrógeno						
Óxido nítrico	Gas incoloro, olor fuerte Soluble agua, benceno y alcohol	Descargas eléctricas Abonos nitrogenados Desnitrificación suelo.	Oxidación (NO ₂ ⁻ y NO ₃ ⁻ arrastrados por la lluvia)	NO ₂ (produce enfermedades de las vías respiratorias) Irritación oculares y de garganta y cefaleas	NO ₂ (anula crecimiento de algunos vegetales)	El NO ₂ produce pérdida de color en los tejidos de las prendas
		Erupciones volcánicas Oxidación N atmosférico por combustión a altas T.	Smog fotoquímico			
Monóxido y dióxido de nitrógeno	NO (tóxico e incoloro) NO ₂ (tóxico de olor asfixiante)					
Compuestos de carbono						
Monóxido de carbono	Gas incoloro, inoloro, tóxico e inflamable	Combustión incompleta de gasolina y oxidación CH ₄ atmosférico	Oxidación con -OH, O ₂	El CO es tóxico, interfiere el transporte de oxígenos a las células		
Dióxido de carbono	Gas incoloro, inoloro, no tóxico	Oxidación del CO	Acumula en atmósfera → efecto invernadero			
Compuestos halogenados						
Cl ₂ , HF, HCl, CFC	Cl ₂ (tóxico e irritante) HF (es corrosivo) CFC (son gases estables, no tóxicos e inflamables)	Cl ₂ (erupciones volcánicas) HCl (industria aluminio) HF (industria del vidrio y cerámica) CFC (fluidos refrigerantes, agentes espumantes y propelentes de aerosoles)	Cl ₂ fotoquímica destrucción del O ₃ HCl (retiene Cl impidiendo su reacción con el O ₃)	Cl ₂ (irritación de las mucosas) HF se acumula en huesos	HF (se acumula en hierbas → cadena trófica. Además, produce la pérdida de color en hojas)	

Tabla 2. Características y efectos de los principales contaminantes atmosféricos.

CONTAMINANTE	CARACTERÍSTICAS	ORIGEN	EVOLUCIÓN EN LA ATMÓSFERA	PRINCIPALES EFECTOS		
				SER HUMANO/ ANIMALES	VEGETALES	MATERIALES
Partículas						
Polvo y aerosoles (PM _{10-2.5-1}) Nieblas Humos	Sustancias sólidas o líquidas, tamaño: 0,1 a 1000 µm, variada composición química, clasificación por tamaño (finas, medias o gruesas)	Aerosoles marinos, erosión eólica, incendios forestales, combustión industriales y domésticas, actividades extractivas, Incineración de residuos agrícolas, ganaderos y urbanos	Deposición en el suelo, constituyen núcleos de condensación en la formación de gotas de lluvia, tiempo de residencia depende del tamaño	Irritación de membranas internas de las vías respiratorias, Disminución capacidad respiratoria	Obstrucción estomas, reducción fotosíntesis, necrosis y caída de hojas	Deposición en edificios, erosión por abrasión en edificios
Compuestos orgánicos						
Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)	Muy abundantes en ciudades y zonas industrializadas	Refinería del petróleo, combustión de motores de gasolina, incendios	Alto tiempo de residencia, bioacumulación	Irritación en ojos y vías respiratorias, PCB y dioxinas alteran el sistema reproductor, dioxinas y furanos poseen efectos cancerígenos y mutagénicos		
		Tratamiento de productos químicos clorados	Alto tiempo de residencia			
Dioxinas y furanos		Incineración de residuos	Depósito en el suelo y agua, bioacumulación			
Metales pesados						
Plomo (Pb)	Deposición en edificios, erosión por abrasión en edificios	Pb (de los gases de tubo de escape de los vehículos que emplean gasolina con plomo) Cd (en industrias metalúrgicas, extracción de metales, incineración de residuos) y Hg (en carbón y actividades agrícolas)	Deposición seca por sedimentación, se integra en el suelo y agua, y se acumulan en las cadenas tróficas	Pb (alteraciones neurológicas y renales, e insuficiencia respiratoria), Cd (problemas cardiovasculares y respiratorios) y el Hg (daños sistema central y riñones)	Bioacumulación	
Cadmio (Cd)						
Mercurio (Hg)						

Entre los contaminantes atmosféricos incluidos en la normativa se incluyen los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) asociados a la materia particulada PM₁₀ (subíndice que indica el diámetro aerodinámico de la partícula, en este caso < 10 µm). Estos compuestos, debido a sus características químicas, como la presión de vapor a temperatura ambiente, se adsorben al material particulado atmosférico de diferente granulometría PM₁₀, PM_{2,5} o PM₁ y los convierten en unos de los componentes tóxicos más importantes de las partículas del aire por lo que son un buen indicador del impacto sobre la salud de la contaminación atmosférica (Espulgues *et al.* 2007).

1.2. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Los HAP se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente y ejercen efectos nocivos en la salud humana debido a sus propiedades carcinogénicas, mutagénicas y teratogénicas. Forman parte de los COP, siendo tóxicos y con una difícil degradación, por lo que su tiempo de vida media en el medio ambiente es largo, lo que hace que se bioacumulen en la cadena trófica y que aparezcan en zonas alejadas de sus fuentes de emisión.

Los HAP son un grupo de compuestos orgánicos que contienen dos o más anillos aromáticos condensados y no contienen heteroátomos ni sustituyentes en su gran mayoría. La estabilidad varía en función de la disposición de los anillos, que puede ser lineal, angular o racimos. En aquellos enlazados linealmente la estabilidad disminuye a medida que se incrementa el número de anillos, donde cada miembro de la serie se convierte en más olefínico y con menor carácter aromático que su predecesor (Pena Sendón, 2010).

Los HAP se encuentran en estado sólido a temperatura ambiente y presentan características comunes como: elevados puntos de fusión y ebullición, presión de vapor baja, solubilidad en agua muy baja pero no en disolventes orgánicos, por lo que son lipófilos (tabla 3). Por este motivo se acumulan en sedimentos, animales y suelos en función de su persistencia. La persistencia aumenta con el tamaño de la molécula, es decir, a mayor peso molecular mayor persistencia en el medio.

En la actualidad se sabe de más de 100 compuestos que forman parte del gran grupo de los HAP y 16 de ellos (figura 2) son considerados contaminantes prioritarios, por organizaciones internacionales como la Agencia Americana de Protección Medioambiental (*EPA, US Environmental Protection Agency*) (Fernández-Amado, 2017).

Tabla 3. Propiedades físico-químicas de los HAP (WHO, 1998).

COMPUESTO	Fórmula Molecular	PM (g/mol)	Tebullición (°C)	Tfusión (°C)	Pv a 25 °C (Kpa)	Solubilidad (mol/L)	Coefficiente reparto n-octanol/agua (log K _{ow})
Naftaleno (Naph)	C ₁₀ H ₈	128,2	218	81	1,04 x 10 ⁻²	2,48 x 10 ⁻⁴	3,36
Acenaftileno (Acy)	C ₁₂ H ₈	152,2	265	92	8,9 x 10 ⁻⁴	2,58 x 10 ⁻⁵	4,07
Acenafteno (Ace)	C ₁₂ H ₁₀	154,2	279	95	2,9 x 10 ⁻⁴	2,55 x 10 ⁻⁵	3,92
Fluoreno (Fl)	C ₁₃ H ₁₀	166,2	295	116	9,0 x 10 ⁻⁵	1,19 x 10 ⁻⁵	4,18
Fenantreno (Phe)	C ₁₄ H ₁₀	178,2	340	100	1,6 x 10 ⁻⁵	7,24 x 10 ⁻⁶	4,57
Antraceno (Ant)	C ₁₄ H ₁₀	178,2	342	216	8,0 x 10 ⁻⁷	4,10 x 10 ⁻⁷	4,54
Fluoranteno (Ft)	C ₁₆ H ₁₀	202,3	375	109	1,2 x 10 ⁻⁶	1,29 x 10 ⁻⁶	5,22
Pireno (Pyr)	C ₁₆ H ₁₀	202,3	393	150	6,0 x 10 ⁻⁷	6,68 x 10 ⁻⁷	5,18
Benzo[a]antraceno (BaA)	C ₁₈ H ₁₂	228,3	400	161	2,8x 10 ⁻⁸	6,14 x 10 ⁻⁸	5,61
Criseno (Chry)	C ₁₈ H ₁₂	228,3	448	254	8,4 x 10 ⁻⁸	8,76 x 10 ⁻⁹	5,91
Benzo[b]fluoranteno (BbF)	C ₂₀ H ₁₂	252,3	481	168	6,7 x 10 ⁻⁸	4,8 x 10 ⁻⁹	6,12
Benzo[k]fluoranteno (BkF)	C ₂₀ H ₁₂	252,3	480	216	1,3 x 10 ⁻¹¹	3,01 x 10 ⁻⁹	6,84
Benzo[a]pireno (BaP)	C ₂₀ H ₁₂	252,3	496	178	7,3 x 10 ⁻¹⁰	1,51 x 10 ⁻⁸	6,50
Benzo[g,h,i]perileno (BghiP)	C ₂₂ H ₁₂	276,3	545	278	1,4 x 10 ⁻¹¹	9,41 x 10 ⁻¹⁰	7,10
Indeno[1,2,3-c,d]pireno (IP)	C ₂₂ H ₁₂	276,3	536	164	1,3 x 10 ⁻¹¹	2,25 x 10 ⁻⁷	6,58
Dibenzo[a,h]antraceno (DBahA)	C ₂₂ H ₁₄	278,4	524	267	1,3 x 10 ⁻¹¹	1,80 x 10 ⁻⁹	6,50

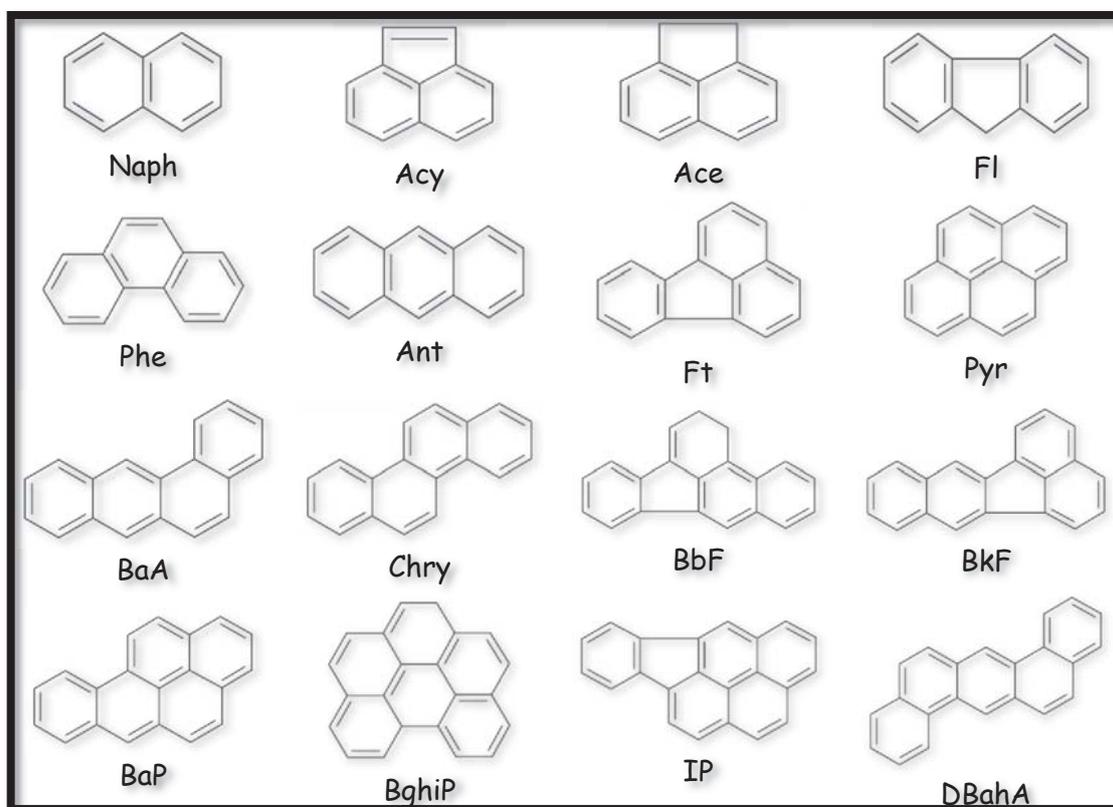


Figura 2. Estructura química de los 16 HAP considerados contaminantes prioritarios por la EPA.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son emitidos por numerosas y diversas fuentes, como productos de pirólisis de compuestos orgánicos. Según la naturaleza de la materia orgánica y la temperatura de la combustión, varía la cantidad de HAP formada. La materia orgánica es fragmentada en radicales libres que se recombinan formando moléculas más estables. En la figura 3 se observa el mecanismo de formación de BaP en un proceso de combustión incompleta. Los HAP también se pueden generar mediante un proceso de formación geológica en los combustibles fósiles sometidos a presión y temperaturas relativamente bajas (de ahí la presencia de HAP en el combustible crudo) o mediante la biosíntesis directa por organismos, aunque esta última no tiene tanta importancia como las anteriores (Pena, 2010).

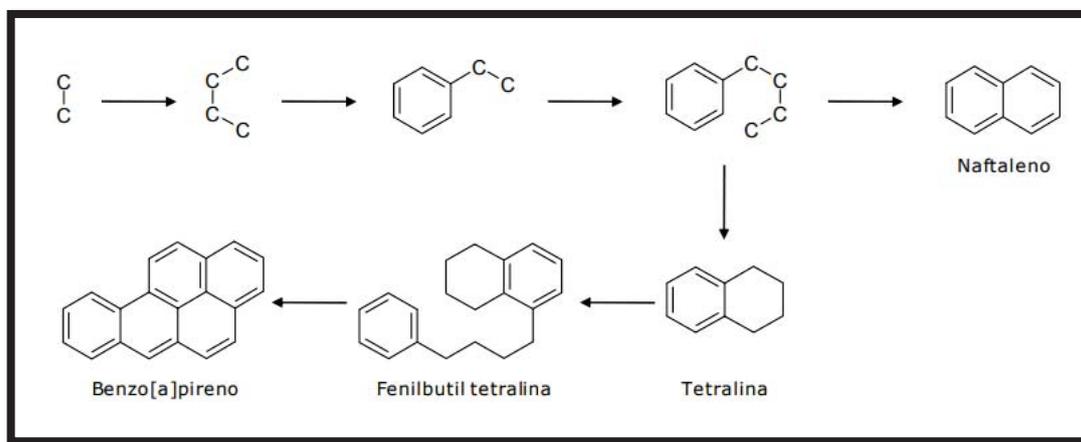


Figura 3. Síntesis del benzo[a] pireno mediante un proceso de combustión.

La industrialización está estrechamente relacionada con la emisión de estos contaminantes, aumentando considerablemente los niveles de concentración de los HAP en las grandes ciudades debido a la cantidad de automóviles y fuentes de combustión (Soriano, 2009). Las principales fuentes antropogénicas son:

- **Fuentes móviles:** Son una de las principales fuentes de emisión de HAP consecuencia de la temperatura del motor de combustión que expulsa estos compuestos mediante pirólisis. También influye factores externos en la cantidad de HAP que se emiten, como la edad y tipo de motor, la temperatura ambiental, el estado de las carreteras y topografía. En general, los compuestos predominantes liberados de los tubos de escape de los vehículos de gasolina y diesel, son los compuestos de bajo peso molecular (2-4 anillos) y fundamentalmente el Naph, Phe, Fl y Pyr; en menor proporción se emiten compuestos de mayor peso molecular, como BaP, BbF, BghiP e IP que van asociados a la fase particulada (Soriano, 2009).
- **Industrias:** Las más contaminantes son las de producción de aluminio y coque, el tratamiento de la madera con creosota, la incineración de residuos, fabricación de cemento, las plantas de generación de energía y las petroquímicas.

- Emisiones domésticas: Están relacionadas con las actividades domésticas como las calefacciones de carbón o madera, tipos de práctica de cocinado (asado o ahumado), uso de motores de combustión interna o incluso fumar.
- Fuentes agrícolas: La quema de biomasa, que consiste en la eliminación de residuos agrícolas y forestales, causa daños como la reducción de humedad del suelo, pérdida de nutrientes, mayor erosión y destrucción de la materia orgánica, emitiendo una gran cantidad de contaminantes.

Cuando estos contaminantes son emitidos a la atmósfera, pueden encontrarse en fase gaseosa o adsorbidos por el material particulado, cuya adsorción depende de su lipofilia, presión de vapor y la solubilidad en agua. En general, los compuestos de dos o tres anillos, menos pesados, son emitidos en fase gaseosa, mientras que los HAP más pesados presentan mayor afinidad a las partículas atmosféricas, sobre todo las más pequeñas ($<1 \mu\text{m}$) (Fernández-Amado, 2017). Según su tamaño, las partículas presentan diferentes efectos en la salud de los seres humanos. Las partículas de mayor tamaño ($< 10 \mu\text{m}$) son generalmente atrapadas en las vías respiratorias superiores y rápidamente eliminadas a través de la tos, estornudo o deglución (Flores, 2019). Tiene especial interés el material particulado con diámetro menor o igual a $1 \mu\text{m}$ y el de menor de $2,5 \mu\text{m}$, ya que son la mayor fracción de partículas inhaladas en la parte más profunda del sistema respiratorio (figura 4), y por lo tanto, donde se concentra mayor cantidad de HAP, constituyendo un riesgo potencial para la salud. Sin embargo, en la actualidad la normativa hace referencia solamente a la fracción de HAP, concretamente de BaP, asociada a la materia particulada PM_{10} .

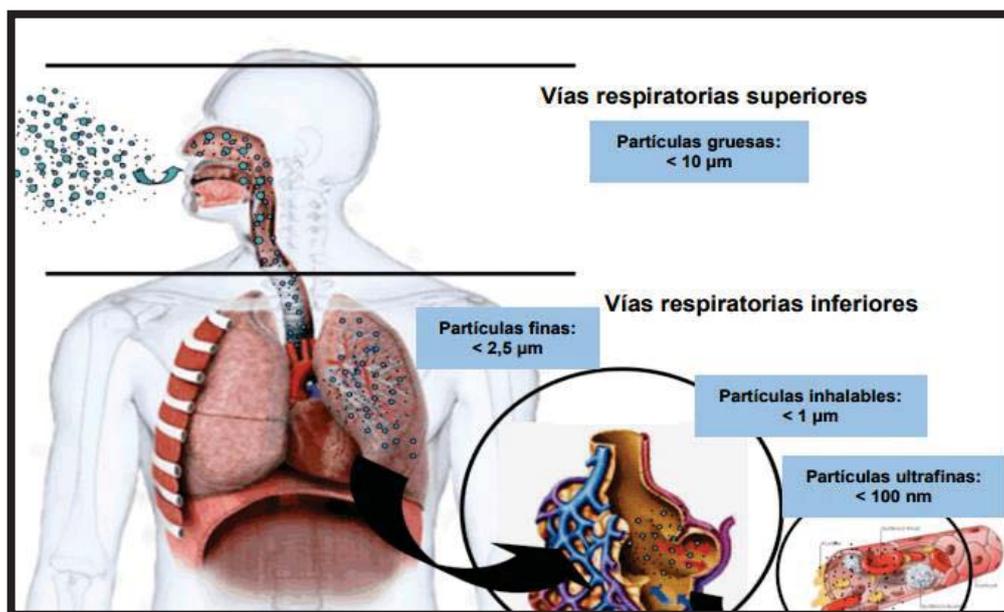


Figura 4. Material particulado y su llegada a las diferentes zonas del tracto respiratorio (Flores, 2019).

La primera referencia histórica sobre la toxicidad de estos compuestos es de 1775, cuando el médico inglés, Sir Percival Pott, describe por primera vez un cáncer de origen laboral que relacionaba con la profesión de los deshollinadores debido a la prolongada exposición a alquitrán y hollín. En el 1930 se relacionó el cáncer de pulmón con los trabajadores de la industria del coque y del acero, donde más adelante, en 1933 se demostró que el BaP del alquitrán de la hulla era cancerígeno (Mastrandea *et al.*, 2005). Las vías de absorción de los HAP en los seres humanos son la inhalación, ingestión y la vía cutánea en menor medida. Por lo tanto, las consecuencias más graves a la exposición de estos contaminantes son la interacción de los HAP con el ADN, produciendo mutaciones que genera cáncer.

La carcinogenicidad por la exposición a los HAP ocurre en varias etapas. Cuando estos compuestos se incorporan al organismo transcurren por un proceso de activación metabólica, que consiste en una oxidación enzimática debido a la acción de las oxidasas de función mixta (OFM) que convierte estos compuestos en epóxidos y dihidrodioles. Estas especies químicas son la forma genotóxica activa de los HAP, que pueden formar aductos covalentes con el ADN, dando lugar a una mutación genética (Pena Sendón, 2010). La aparición de cáncer también está influenciada por la susceptibilidad individual, edad, sexo, etnia, estado de salud, nutrición y polimorfismo genético. Por otra parte, la exposición prolongada de los HAP sobre la piel está relacionada con la dermatitis aguda y crónica, además de causar pigmentación en las zonas de la piel expuestas con escamación severa. En los ojos producen fotofobia, edema de párpados, lagrimeo e hiperemia conjuntival.

Como los HAP están relacionados con la aparición de numerosas enfermedades, las autoridades han fijado valores máximos en diferentes matrices: aire, suelos, aguas, alimentos, etc. para evitar exposiciones que supongan un problema para la salud pública. La sociedad, al tener mayor conciencia a día de hoy de esta problemática, ha empezado a tomar soluciones para disminuir la emisión de los HAP, aunque todavía no estamos en una situación ecotoxicológica ideal. Históricamente, se ha utilizado el BaP como elemento de referencia en diferentes estudios ambientales, debido a que posee un tiempo de vida largo, la capacidad de desarrollar efectos carcinogénicos, genotóxicos y/o mutagénicos y se encuentra presente en la mayoría de las fuentes de emisión (Mastrandea *et al.*, 2005).

En lo relativo a la calidad del aire las normativas estatal y europea, tan solo hace referencia al BaP con un valor objetivo promedio anual de $1 \text{ ng} \cdot \text{m}^{-3}$ asociado a las partículas PM_{10} . Sin embargo, también se hace referencia al control de otros HAP como el BaA, BbF, BjF, BkF, IP y DBahA, pero sin especificar valores límites para ellos.

1.3. LOS MUSGOS COMO BIOINDICADORES DE LA CALIDAD DEL AIRE

Debido a que los hidrocarburos aromáticos policíclicos suponen un riesgo para el medio ambiente y la salud humana, es necesario el control de la calidad del aire. En las últimas décadas se ha realizado numerosas investigaciones sobre las técnicas de monitorización del aire, destacando los métodos físico-químicos de referencia en las normativas, como, por ejemplo, los muestreadores para partículas atmosféricas PM₁₀ y PM_{2,5}, haciendo pasar el aire a través de filtros de vidrio o cuarzo, donde se recoge la materia particulada sobre la que se determinan la concentración de los HAP (Mukhopadhyay *et al.*, 2020). Sin embargo, el coste del muestreador es elevado y necesita de un mantenimiento, sin contar el tratamiento de los filtros empleados para el muestreo.

Un método complementario para monitorizar el impacto de un contaminante en una zona determinada es el empleo de organismos biológicos ya que integran la influencia de los parámetros abióticos y bióticos en su hábitat, llevando a cabo un registro continuo de la calidad ambiental.

Un bioindicador puede ser cualquier entidad biológica (microorganismo, organismo o una comunidad), capaz de reflejar una cualidad ambiental, perceptible a la vista o no, debido a que presentan algún tipo de respuesta a las modificaciones medioambientales. Se habla de bioindicación cuando se refiere a una información cualitativa (empleo extendido de líquenes) mientras que la biomonitorización se dirige más hacia una información cuantitativa (utilización de los musgos).

Las características principales, a nivel especie, para que ser un buen biomonitor son: amplia distribución geográfica, disponibilidad durante todo el año, vida media alta, fácil muestreo e identificación, abundante, accesible y con biomasa suficiente para el posterior análisis, buena capacidad de bioacumulación, tolerante a las variaciones ambientales y contaminantes, nula capacidad de regulación corporal, fácil almacenamiento y conservación, fácil manejo en laboratorio (Martí Ezpeleta, 2000). Hoy en día se usan todo tipo de organismos como biomonitores: los protozoos, plantas (líquenes, briofitos, plantas vasculares) y animales vertebrados e invertebrados.

Este trabajo fin de grado se centra en el empleo de musgos como biomonitores y en sus características como bioacumuladores de contaminantes presentes en el aire.

A principios de los 60 se empezaron a utilizar los musgos para los estudios de la calidad del aire en Suecia, y desde entonces ha sido una técnica ampliamente utilizada. El uso tan extendido de los musgos como biomonitores de la calidad del aire es debido a sus características físico-químicas, permitiendo una alta capacidad de intercambio catiónico y así acumular las sustancias que les llegan como consecuencia de la deposición tanto húmeda como seca (Ares *et al.*, 2012).

Los musgos pertenecen al grupo de plantas Bryophyta, de pequeño tamaño, la mayoría entre 1 y 10 cm, aunque los hay más grandes. Son plantas principalmente no vasculares con un tallo frondoso que soporta los órganos reproductivos y uno o más esporofitos. La falta de sistema vascular, raíces o cutícula protectora hace que el agua y nutrientes procedan de la deposición atmosférica, por ello, los contaminantes presentes en los tejidos del musgo provienen de la atmósfera. Además, presenta una gran superficie de contacto debido a los numerosos filidios (apéndice aplanado parecido a una hoja típico de los briófitos con morfología foliosa) alrededor del talo, y esto hace que puedan atrapar las partículas atmosféricas eficientemente (UNE-EN 16414, 2014).

Debido a sus características físicas previamente comentadas, los musgos presentan numerosas ventajas como biomonitores (Pérez Hernández, 2018):

- Son organismos con una amplia distribución en diferentes nichos ecológicos, incluyendo áreas industriales y urbanas.
- No tienen una cutícula externa que les proteja de los contaminantes y por lo tanto están completamente expuestos a los mismos.
- Son organismos poiquilohidros (carecen de un mecanismo para regular el contenido hídrico y prevenir la desecación) con una capacidad para permanecer en estado de latencia cuando las condiciones de hidratación no son las favorables y esto les otorga una gran capacidad de resistencia a los cambios climáticos.
- Han sido ampliamente estudiados durante muchos años y por lo tanto se sabe cuál es su respuesta a diferentes tipos de contaminantes.
- Hay una correlación simple entre la cantidad de contaminante asimilado y la que hay en su entorno.
- Pueden ser recogidos durante todo el año, debido a que son organismos perennes.

Aparte del tipo de organismo que se utilice para el estudio de la calidad del aire, hay que tener en cuenta una serie de factores externos y/o ambientales que influyen en el contenido, en los musgos, de los contaminantes objeto de estudio. Los factores han de ser lo más uniformes posibles para todas las muestras a la hora de realizar estudios de biomonitorización (cuantificación). Los más importantes que podríamos citar son:

- Precipitaciones: la naturaleza de la precipitación afecta a los procesos de carga.
- Cubierta vegetal: la precipitación es interceptada en la superficie de las plantas, por lo que la concentración elemental en los musgos que se encuentran debajo de los árboles variará en comparación con la de los musgos que no están cubiertos.

- Efectos catiónicos: si se encuentran altas concentraciones de algunos cationes en la deposición atmosférica, estos afectarán a la carga de otros cationes por fenómenos de competencia entre los iones.
- Edad del musgo: los musgos captan los distintos elementos a lo largo de la vida de sus tejidos, por ello, a la hora de realizar estudios comparativos es importante tener en cuenta este factor.
- Estación: los diferentes fenómenos ambientales que se producen a lo largo del año producen variaciones en la deposición de los contaminantes.
- Morfología y capacidad de acumulación: la capacidad de captación de unos elementos frente a otros variará según la especie de musgo y su morfología.

En los estudios de biomonitorización se emplean, generalmente, dos géneros de musgos (figura 5):

- Los musgos Pleurocarpus que incluyen, entre otros, el *Pleurozium schreberi*, *Hylocomium splendens*, *Hypnum cupressiforme*, *Pseudoscleropodium purum*, etc. Se caracterizan por presentar tallos ramificados y estructuras densamente enmarañadas.
- Los musgos Acrocarpous, que incluyen el *Ceratodon purpureus*, *Polytrichum sp.* que se caracterizan por no estar ramificados y presentar un tallo central.

Los musgos pleurocarpus son utilizados en la mayoría de los estudios de determinación de los HAP en la atmósfera debido a que gracias a su estructura enmarañada los separa del suelo y capturan directamente todos los nutrientes mediante deposición atmosférica (Mukhopadhyay *et al.*, 2020).



Figura 5. (a) *Pseudoscleropodium purum* (b) *Ceratodon purpureus*.

Hay dos tipos de biomonitorización en el uso de los musgos: la biomonitorización pasiva, que utilizan el musgo que crece en una zona determinada (musgo autóctono o nativo) y se utiliza para estudios de áreas grandes, y la biomonitorización activa, donde los musgos son trasplantados de otras zonas y se usa para estudios de áreas más pequeñas.

Este último resuelve varios problemas asociados con la biomonitorización pasiva, por ejemplo:

- superar la escasez o ausencia de musgo en ciertos ambientes y/o áreas,
- reduce el alto grado de variabilidad en la captación de contaminantes por el musgo nativo dentro del mismo sitio de muestreo,
- son más convenientes para la interpretación de los resultados relacionado con la variabilidad temporal.

A la hora de realizar un estudio de biomonitorización pasiva, se debe seleccionar un diseño de muestreo apropiado basado en los objetivos del estudio y en la información específica del área:

- Musgo: mediante una inspección preliminar del área de estudio se determina la especie de musgo más distribuida y más adecuada.
- Área de estudio: verificar que las áreas de estudio no están restringidas.
- Mapas: mediante el uso de mapas o fotos aéreas se verifica que no estén presentes más fuentes de emisión de contaminantes que puedan afectar al resultado del estudio.

La realización de estos estudios es llevada a cabo bajo unas normas rigurosas y unas condiciones establecidas, de manera que se evalúe de la misma manera que las mediciones fisicoquímicas y la modelización, aplicados en la gestión de la contaminación. Un ejemplo de una monitorización pasiva se llevó a cabo en Galicia entre los años 1995 y 1997 donde se seleccionaron alrededor de 75 zonas repartidas en toda la Comunidad Autónoma (figura 6) que se localizaban cerca de focos contaminantes (Fernández *et al.*, 2000). Se eligió para este estudio las especies predominantes de la zona, *Scleropodium purum* e *Hypnum cupressiforme*, para la determinación de metales pesados y por último, gracias a las cartografías permitieron confirmar el efecto de los focos contaminantes, la extensión de las zonas afectadas y la existencia de otro focos de contaminación no inventariados.

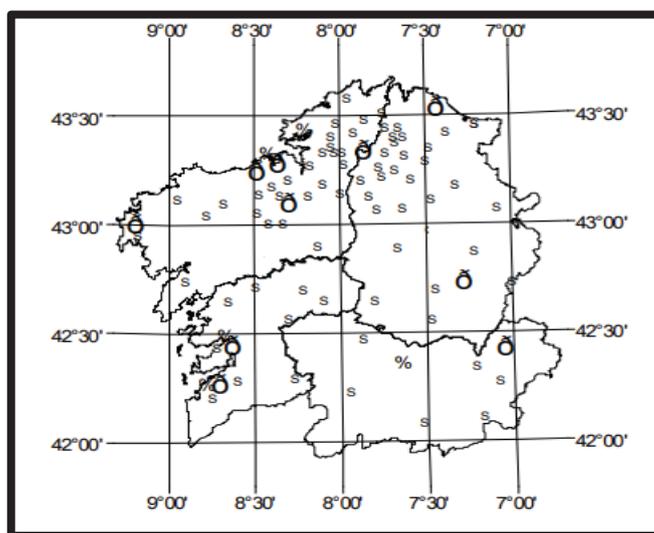


Figura 6. Localización de las estaciones ecológicas de musgos en Galicia (Fernández *et al.*, 2000).

A nivel europeo en el proyecto “*European Metals in Mosses Survey*”, integrado en el programa “ICP-vegetation”, se demostró como los musgos permiten dar cumplimiento a todos los objetivos en diferentes escalas geográficas (figura 7). El objetivo de este proyecto era identificar las zonas más contaminadas, por ello, entre el año 2015/2016 realizaron la biomonitorización con musgo nativo de metales pesados presentes en la atmósfera en los 36 países participantes. Se muestrearon alrededor de 5000 especies de musgo, en distintos puntos de muestreo ubicados, al menos, a 300 m de las carreteras y áreas pobladas y, al menos, a 100 m de cualquier carretera o casa unifamiliar. En bosques o plantaciones, las muestras se recolectaron en la medida de lo posible en espacios abiertos. La especie *Pleurozium Schreber* (39,6%), fue la más muestreada, seguida de *Hypnum cupressiforme* (23,1%), *Hylocomium splendens* (19,9%), *Pseudoscleropodium purum* (6,3%) y otras especies (11,2%). La encuesta proporciona datos sobre concentraciones de nitrógeno y 12 metales pesados en musgo: Al, Sb, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, V y Zn.

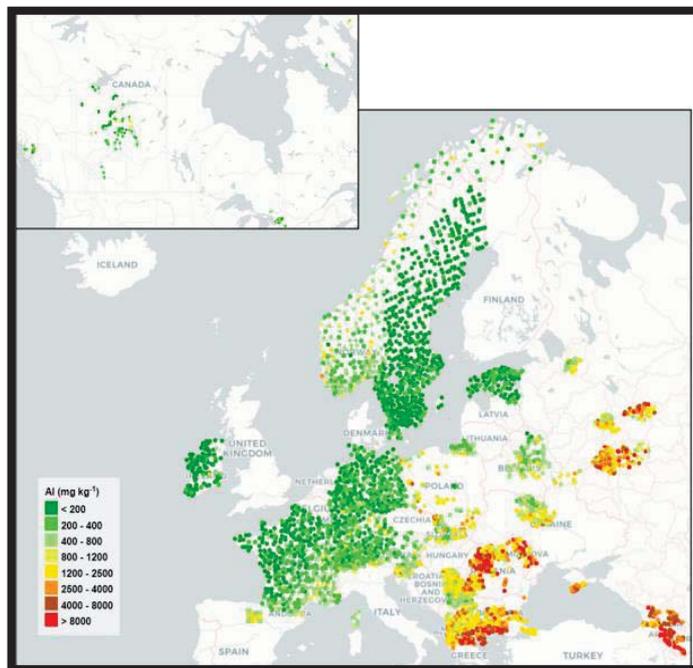


Figura 7. Concentración de aluminio en Europa utilizando musgos (ICP-Vegetation, 2015/2016).

Cuando están definidos los puntos de muestreo, se desarrolla una estrategia de muestreo, con el fin de controlar y reducir los efectos de los parámetros ambientales en la concentración de contaminantes en el musgo (tabla 4)..

Tabla 4. Estrategia de muestreo (UNE-EN 16414, 2014).

Especie de musgo	<p><i>Abundancia:</i> La especie debe ser abundante para mayor durabilidad y conseguir mayor biomasa.</p> <p><i>Ubicuidad:</i> La especie elegida debe ser tan variada como sea posible.</p> <p><i>Estado de protección:</i> La especie elegida no debe de estar protegida.</p> <p><i>Identificación:</i> La especie elegida ha de ser fácil de identificar.</p>
Periodo de recogida	<p>Tiempo de recogida lo más corta posible.</p> <p>Condiciones meteorológicas constantes.</p> <p>Época del año.</p>
Recogida de musgo	<p>Los musgos se deben recoger en áreas abiertas, sin cubierta.</p> <p>La superficie del sustrato debería ser tan a nivel como sea posible para evitar el enriquecimiento de la deposición debida al efecto de la pendiente.</p> <p>Mismo sustrato en todas las diferentes unidades de muestreo.</p>

A la hora de llevar a la práctica un procedimiento de muestreo (tabla 5), no siempre es posible la obtención de una muestra monoespecífica ya que no se consigue una completa limpieza por el solapamiento del musgo con el sustrato u otras especies. Por ello, durante el trabajo de campo, es muy importante concentrarse en la especie objetivo para una fácil limpieza posterior en el laboratorio (UNE-EN 16414, 2014).

Tabla 5. Procedimiento de muestreo (UNE-EN 16414, 2014).

ETAPA	OBJETIVO	
Muestra de musgo	Comparación específica entre especies	La muestra de musgo ha de ser monoespecífica con el fin de evitar variaciones de concentraciones en las muestras.
	Representativa	Recogida de submuestras homogéneamente distribuidas dentro de la unidad de muestreo (figura 6). Las submuestras se han de combinar para crear una unidad de muestreo representativa.
Recogida	Materiales	Materiales inertes que no interaccionen con los contaminantes a analizar.
	Cantidad	Según los requisitos del procedimiento analítico.
	Colocación	Las submuestras, al ser recogidas, deben ser colocadas unas al lado de otras y con las partes verdes en contacto, en un contenedor cerrado para evitar contaminación durante el transporte.
Empaquetado	Contaminantes orgánicos no volátiles/semivolátiles	Contenedores inertes pre-etiquetados.
	Contaminantes orgánicos volátiles	Tubos de aluminio o vidrio ámbar pre-etiquetados. Temperatura inferior a 4°C si el análisis es en 24 h. Temperatura entre -18°C y +2°C en análisis posteriores a 24h.
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA		
Limpieza	Eliminar los detritus de plantas, animales y minerales adheridos a los brotes sobre una superficie de material inerte. No lavado. Misma parte del musgo a analizar en todas las muestras.	
Homogenización	Después del secado y la limpieza. Cualquier equipo de molienda, pero libre de contaminantes.	
Almacenamiento	<i>No volátiles:</i> Se pueden almacenar siempre y cuando el método y la duración del almacenamiento no influya en la concentración de los contaminantes. Lejos del calor, luz y humedad. <i>Volátiles:</i> Deben ser analizadas después de la limpieza lo antes posible.	

Las principales desventajas de la biomonitorización pasiva son:

- Musgo inexistente en el área de estudio. Es posible que el efecto tóxico de la deposición genere los denominados desiertos industriales o que no exista musgo de forma natural debido a zonas de alta antropización.
- Estandarización del material. Este método no permite estandarizar el tiempo de exposición y la carga inicial del contaminante.
- Malla de muestreo. En los musgos nativos el muestreo se tiene que adecuar a la realidad mientras que con el activo no es necesario.

- Eliminación de las adaptaciones del musgo a la toxicidad. El musgo puede adaptarse a la contaminación mediante mecanismos fisiológicos. Con los cortos tiempos de exposición que presenta la biomonitorización activa, estos mecanismos no se llegan a desarrollar, por lo que obtendremos un musgo con mayor concentración sin interferencias y mucho más sensible que el nativo.

Con el paso de los años, las desventajas que presenta el método de biomonitorización pasiva llevaron al desarrollo de otra técnica capaz de resolver estos factores, conocido como biomonitorización activa (*moss bag* o bolsa de musgo). La técnica “*moss bag*” (figura 8) consiste en el trasplante de musgos recolectados de zonas no contaminadas que, tras una posterior preparación e introducción en mallas de muestreo, se exponen en condiciones controladas (tiempo de exposición, altura sobre el suelo, localización, etc.) que será posteriormente analizada en el laboratorio.



(a)

(b)

(c)

Figura 8. Moss bag: (a) esfera (b) tipo sobre (Capozzi *et al.* 2016) (c) muestreo de campo (<http://www.envpl.ipb.ac.rs/bio2.htm>)

Esta técnica fue introducida por Goodman y Roberts (1971) basada en la utilización de pequeñas bolsas de red de nylon con musgo trasplantado preparado para ser expuesto en el medio ambiente. Esto ofrecía una alta representatividad de datos y rentabilidad, confirmando su utilidad, alta sensibilidad y versatilidad. En las últimas décadas, las investigaciones se dirigen hacia la optimización y estandarización del método, ya que uno de los principales problemas de esta técnica es que todos los resultados publicados son generalmente comparables sólo dentro de los mismos entornos de investigación debido a la falta de un protocolo experimental compartido y estandarizado que va desde la elección de la especie de musgo y la preparación de la bolsa, hasta los tratamientos previos y posteriores a la exposición y las condiciones de exposición (Capozzi *et al.*, 2017). Se lograron avances en la estandarización de la biomonitorización de las “*moss bag*” por Ares *et al.* (2012 y 2014), abordando los aspectos clave que se indican en la tabla 6 como la toma de muestra de y tratamiento del musgo, así como, la preparación de las bolsas y su exposición.

Tabla 6. Monitorización empleando “ moss bag” .

PASOS	OBJETIVO	CRITERIOS			
PRE-EXPOSICIÓN	<p>Seleccionar la especie de musgo adecuada. Selección del material. Tratamiento pre- exposición.</p>	<p>Distribución e información disponible del musgo Características estructurales y fisico-químicas para mejor captación de los contaminantes</p> <p>Disponibilidad de brotes verdes y mismas propiedades fisico-químicas</p> <table border="1" data-bbox="501 192 603 981"> <tr> <td data-bbox="501 703 603 846">Lavado con agua</td> <td data-bbox="501 439 603 703">Tratamientos desvitalizantes</td> <td data-bbox="501 192 603 439">Secado de la muestra</td> </tr> </table>	Lavado con agua	Tratamientos desvitalizantes	Secado de la muestra
Lavado con agua	Tratamientos desvitalizantes	Secado de la muestra			
TRASPLANTAR	<p>Extraer una porción de musgo de un área sin contaminar y trasplantarla a un área contaminada con una bolsa de red de malla.</p>	<p>La composición más común de este tipo de bolsa es de nylon ya que interfiere menos en el proceso de absorción</p> <p>El tamaño se elige priorizando la maximización de la interceptación de la deposición aérea y la minimización del riesgo de pérdida de material</p> <p>Forma tridimensional: recolección uniforme de todas las direcciones y sedimentación gravitacional Forma dimensional: exposición uniforme y compartimentos dentro de la bolsa para evitar que el musgo se desplace más a dentro de la bolsa.</p> <p>Disponibilidad de musgo con respecto al diseño experimental y limitaciones analíticas Pérdidas de musgo en la exposición</p> <p>Bolsas individuales de plástico selladas Temperatura ambiente (-20°C)</p>			
EXPOSICIÓN	<p>Los diferentes sistemas de exposición y su combinación afectarán a la concentración de contaminantes en la muestra</p>	<p>Vertical (captura de contaminantes transportados por flujo horizontal) y horizontal (por gravitación y deposición húmeda)</p> <p>Lejos de obstáculos que interfieren la exposición y a una determinada altura con un soporte (inerte)</p> <p>Altura baja (para saber la contaminación de zonas cercanas) Altura más alta (para saber la contaminación de zonas lejanas)</p> <p>1 semana-20 meses</p> <p>1-30 bolsas</p>			

El método propuesto es el empleo de la especie *Sphagnum*, ya que es la que proporciona los mejores resultados, con un lavado previo con agua y su exposición en bolsas de nylon (2 mm) con forma esférica a 4 metros de altura durante 30-45 días. Sin embargo, la técnica de “moss bag” presentaba una serie de limitaciones: la disponibilidad del musgo natural y no contaminado, la variabilidad natural en la composición elemental del musgo y la ausencia de un material verificado y normalizado.

Para mejorar la biomonitorización las investigaciones se centraron en el cultivo, en el laboratorio, de un clon seleccionado de musgo para tener siempre un material limpio y homogéneo. Esto fue desarrollado en 2015 en el proyecto europeo “MOSSclone”, financiado en el séptimo Programa Marco (CORDIS, *Community Research and Development Information Service*). El objetivo fue desarrollar y aplicar un método para controlar la calidad del aire mediante el uso de un clon de musgo desvitalizado como sensor pasivo de contaminantes para utilizarlo en un futuro cercano como muestreador pasivo para monitorizar la calidad del aire en toda Europa. Para el desarrollo de este proyecto, se tenía que buscar una solución a los siguientes puntos:

- Selección de especies de musgo: estudio de sus características físico-químicas y su uso como biomonitor.
- Creación de un biorreactor piloto para el cultivo de la especie seleccionada.
- Caracterización del clon de musgo seleccionado: composición química, morfológica molecular y caracterización físico-química.
- Ampliación del cultivo de clones de musgo desde el biorreactor piloto hasta la producción de clones a gran escala.
- Diseño y estandarización de bolsas de musgo: tipo de malla, forma y relación peso musgo/tamaño de la bolsa.

Los principales resultados fueron el cultivo axénico *in vitro* por esterilización de la superficie de las esporas y los gametóforos de la especie *Sphagnum palustre*, en unas condiciones determinadas. Para su cultivo se emplearon biorreactores de 12 L (figura 9a) que producían 150 g de musgo desvitalizado. Posteriormente, se colocan 15 mg musgo/cm² en las bolsas *Mossphere*[®] de malla de nylon de 2 mm (figura 9b) y se exponen a una altura de 4 m durante 6 semanas. Estas bolsas aseguran el libre paso del aire y la distribución homogénea del musgo (Decker y Reski, 2020). Esta “bioherramienta” presenta claras ventajas con respecto a los sistemas hasta ahora desarrollados: es más económico, menor impacto medioambiental, mayor representatividad y menor variabilidad de los resultados, la capacidad de medir diversos contaminantes en el mismo dispositivo y la capacidad de medir los contaminantes que no pueden ser monitorizados con la tecnología actual.



Figura 9. (a) Fotobiorreactor (b) Mossphere®.

Además, los resultados obtenidos por Mossclone suponen un impulso para la investigación e innovación en los próximos años, por lo que conducirá al desarrollo de nuevos clones, mejoras en las condiciones de cultivo y facilitará el análisis de las nuevas especies de musgo. En resumen, el proyecto Mossclone ha desarrollado una herramienta barata y eficaz para la vigilancia de la calidad del aire que se puede implantar a gran escala de forma muy sencilla. De esta manera, los estados miembros de la UE podrán cumplir con la nueva legislación y mejorar la calidad del aire que respira. Por último, la disponibilidad de estos datos permitirá realizar comparaciones entre distintas zonas, sin verse afectados los resultados por las condiciones del musgo nativo. Estos datos permitirán una mejor comparación con los obtenidos por métodos físico-químicos y serán utilizados como base de estudios epidemiológicos.

1.4. PROCEDIMIENTOS ANALITICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN MUSGOS

El gran interés del empleo de musgos como biomonitores de la calidad del aire hizo necesario el desarrollo de procedimientos analíticos eficientes para el análisis de los contaminantes retenidos en este tipo de muestras. Este tipo de análisis en matrices ambientales es siempre una tarea difícil, no sólo por la complejidad de las muestras, sino también por las concentraciones a nivel traza de los contaminantes a determinar.

El procedimiento analítico incluye: un pretratamiento de la muestra (secado, trituración, tamizado) seguido de las etapas de extracción, purificación o limpieza del extracto y su concentración para obtener un adecuado extracto final, enriquecido en analito, como paso previo a la determinación instrumental. Por todo ello, la preparación de la muestra sigue siendo una de las etapas más laboriosas y prolongadas del procedimiento analítico y la que puede determinar en la mayoría de los casos el éxito del análisis, tanto en la calidad de los resultados obtenidos como en su aplicabilidad, coste, tiempo de análisis, etc. (Wianowska *et al.* 2019).

PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA

En esta etapa se realizan los procesos químicos y físicos sobre la muestra como paso previo al análisis. En esta etapa ha de garantizar la representatividad de la muestra, la preconcentración del analito y simplificar la matriz de la muestra para minimizar los errores que su presencia pueda ocasionar en la determinación posterior. Los procesos de secado, homogeneización, y también posteriores submuestreos, son muy generales para las muestras sólidas (Palacios Ansón, 2018).

- Secado. Es importante que la muestra no contenga agua ya que puede producir alteraciones durante el análisis, como una disminución de la eficiencia de extracción. La operación puede realizarse en estufa y/o mediante liofilización, esta última es la más adecuada cuando hay riesgo de pérdida de compuestos volátiles.
- Homogeneización. Cuanto menor sea el tamaño de la partícula y la muestra más homogénea, menor será el error del análisis, ya que habrá mayor superficie expuesta al disolvente. Los equipos utilizados son morteros, trituradores para muestras duras y blandas.
- Reducción del tamaño de muestra. Si la cantidad de muestra es excesiva, se realizará un proceso de reducción cuidando de que la parte a separar sea representativa de la muestra inicial. La muestra se conservará hasta su análisis, almacenándolo de la forma adecuada según la muestra y el analito.

EXTRACCIÓN DEL ANALITO

La etapa de extracción permite el aislamiento completo del analito, su concentración, la separación de la matriz y la eliminación de los compuestos que interfieren (Borcellos y Pizzolato, 2018). Es un paso crucial para la identificación precisa y óptima de los analitos a estudiar. Se pone en contacto la muestra con un disolvente para conseguir una eficiente separación del analito de la matriz con un buen rendimiento y en un tiempo razonable.

Durante este proceso, el extracto se enriquece en analito mediante la transferencia de masa gracias al coeficiente distribución, que se define como la relación entre la concentración del analito en la matriz y la del extracto en el equilibrio. Las técnicas convencionales de extracción son la extracción Soxhlet y la asistida con ultrasonidos, pero en los últimos años numerosos autores han introducido nuevas técnicas de extracción con el empleo de la energía de microondas (*Microwave Assisted Extraction*, MAE), extracción con disolventes a presión (*Pressurized Solvent Extraction*, PSE) y la dispersión de la matriz en fase sólida (*Matrix Solid Phase Dispersion*, MSPD) entre otras técnicas (Szulejko *et al.* 2014).

Uno de los principales factores que afectan al proceso de extracción es la elección del disolvente adecuado, que dependerá de la solubilidad de los HAP que está relacionado con la polaridad del disolvente y las interacciones disolvente-matriz. Además, el disolvente debe de ser no tóxico, inerte y químicamente estable para evitar reacciones con los analitos, y además de presentar determinadas propiedades físico-químicas como la presión de vapor o punto de congelación bajos, para facilitar su manipulación (eliminación del disolvente y almacenamiento de los extractos obtenidos). El diclorometano (DCM), hexano (HEX), mezclas de acetona/ hexano (ACE: HEX), metanol (MeOH), dietil éter (DE) y acetonitrilo (ACN) son los disolventes utilizados.

Las condiciones de extracción como la temperatura y la presión son factores clave en la eficiencia de la extracción. Así, una alta temperatura favorece el contacto entre el disolvente y los analitos ya que disminuye la densidad y la viscosidad del disolvente, además de debilitar las interacciones analito-matriz. Por otro lado, una presión adecuada puede facilitar la extracción de los analitos atrapados en los poros de la matriz y también mantener el disolvente en fase líquida con la ayuda de una temperatura elevada. Una temperatura alta con la presión necesaria reduce la tensión superficial del disolvente que penetra a través de los poros y llega a zonas de la matriz que no están debidamente expuestas a los disolventes debido a la obstrucción de los poros causada por burbujas de aire o agua; así entra en contacto con los analitos y aumenta la eficiencia de extracción (Mukhopadhyay *et al.*, 2020).

Otros de los factores a tener en cuenta son las características de la matriz (tamaño de la partícula, tamaño del poro, composición química, pH, etc.) que influyen en las interacciones analito-matriz y en el tiempo de extracción, que es proporcional a la cantidad de analito extraído. Además, un adecuado tiempo de extracción, reduce el consumo de energía, así como, el coste del proceso.

Inicialmente, la técnica más común para la extracción de HAP en musgos es la extracción Soxhlet, que demanda una gran cantidad de volumen de disolventes orgánicos altamente purificados y un largo tiempo de extracción (Concha-Graña *et al.*, 2015). Es un método convencional para la extracción de analitos orgánicos en muestras sólidas desde su creación en el 1879. Se considera el principal método de referencia frente al que se validan otros métodos de extracción desarrollados; de hecho, las ventajas y limitaciones de esta técnica se han utilizado como puntos de partida para el desarrollo de nuevas técnicas de extracción.

En este procedimiento, la muestra seca y pulverizada se coloca en un cartucho poroso que se sitúa en la cámara del extractor Soxhlet (figura 10). El disolvente, se introduce en un matraz de balón que lleva a ebullición con ayuda de una fuente de calor y los vapores generados suben por el sifón hasta llegar al refrigerante. El vapor de disolvente condensado cae sobre la muestra, extrayendo los analitos solubles en el disolvente. El extracto obtenido se acumula en el sifón hasta que alcanza el nivel suficiente para volver el matraz de ebullición. El disolvente limpio recircula de nuevo, repitiendo el proceso hasta que se complete la extracción (Pena Sendón, 2010). La cantidad de muestra, volúmenes de disolvente y tiempo de extracción dependerá de cada tipo de muestra y se optimizará para cada procedimiento.



Figura 10. Extractor Soxhlet.

Este método presenta ventajas como el contacto repetido de la muestra con disolvente fresco, que no hace necesaria una filtración posterior y la obtención de buena recuperación. Los principales inconvenientes que presenta son el tiempo de extracción (8-48 h) y el elevado consumo de disolventes (100-200 mL) con la consiguiente costosa eliminación de los mismos. Por último, que los analitos sean extraídos en el punto de ebullición del disolvente puede generar la descomposición térmica de especies termolábiles perdiéndose analito. Después de la extracción, la gran cantidad de volumen de extracto obtenido requiere un proceso de evaporación- extracción (Luque de Castro y Priego-Capote, 2010).

Otra técnica convencional es la extracción asistida por ultrasonidos (US) que son ondas generadas debido a la transmisión de energía de una corriente eléctrica a un sistema mecánico, convirtiéndola en vibraciones con una frecuencia de 16 kHz a 1 GHz. Estas ondas, generan vibraciones en la muestra y además en el disolvente genera millones de burbujas, las cuales sufren procesos de implosión, y produce microgradientes con presiones y temperaturas elevadas. Este fenómeno es conocido como cavitación (figura 11) que favorece la penetración del disolvente en la muestra y el transporte de masa, además de una mejora en la solubilidad y difusividad, desplazando el equilibrio de la partición (Pena Sendón, 2010). Las muestras con el disolvente son introducidas en un baño ultrasonidos. Con respecto al Soxhlet, sí es necesaria una posterior filtración y/o centrifugación. La eficiencia de la extracción depende del tipo de disolvente, frecuencia e intensidad, tiempo de la extracción y el tamaño de la partícula de la muestra. Una de las principales ventajas de la técnica de ultrasonidos es que es

una técnica barata, ya que no se necesita un equipo especializado y es una técnica adecuada para la extracción de analitos termolábiles, ya que las extracciones se pueden realizar a temperaturas poco elevadas. Entre los principales inconvenientes se encuentra el elevado uso de disolvente, la necesaria etapa de filtración y/o centrifugación después de la extracción y que no es una técnica automatizable (Barrado *et al.*, 2013).

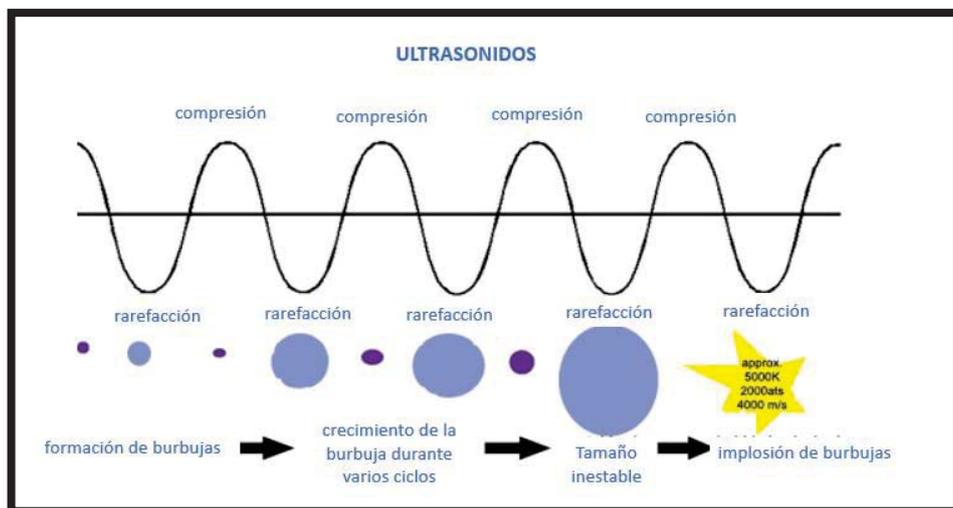


Figura 11. Fenómeno de cavitación.

Con el fin de reducir los principales inconvenientes de las técnicas anteriormente descritas, pero manteniendo la eficiencia de extracción, se hizo necesario el desarrollo de nuevas técnicas alternativas. Así surge la técnica de extracción asistida por microondas (MAE), que es más eficiente y rápida que los procedimientos tradicionales de líquido-sólido, permitiendo la extracción simultánea de varias muestras (6-12) con un volumen de disolvente 10 veces menor que el requerido en la extracción Soxhlet y también por debajo de lo requerido en los ultrasonidos. El principio de esta técnica consiste en que la radiación provocada por estas ondas electromagnéticas interacciona con la materia dando lugar al desplazamiento de iones y tránsitos rotacionales, sin provocar cambios en la estructura molecular. La transformación de energía electromagnética en energía calorífica tiene lugar mediante la conducción iónica y la rotación dipolar (figura 12). La conducción iónica se produce por la migración electroforética de iones, cuya resistencia de la disolución a este flujo de corriente origina pérdidas de energía. La rotación dipolar es causada por el movimiento de las moléculas con los momentos dipolares, que al someterse a un campo eléctrico tiende a alinearse. Cuando deja de aplicarse el campo eléctrico, se restaura el desorden molecular, y se producen múltiples colisiones debidas a la agitación térmica, generando energía que se libera en forma de calor (Pena Sendón, 2010). A la hora de utilizar esta técnica hay que tener en cuenta las principales variables que influyen en el proceso de extracción: la naturaleza y volumen de disolvente, la temperatura, el tiempo de extracción y la naturaleza de la matriz). Presenta numerosas ventajas como ser una técnica rápida y

fácil de usar, con un rendimiento de extracción elevado, bajo consumo de disolvente y fácil control de todos los parámetros de extracción, la hacen una alternativa interesante a los métodos tradicionales de extracción sólido –líquido para la extracción de compuestos orgánicos. Sin embargo, presenta la desventaja de la necesidad de realizar una centrifugación o filtración posterior para eliminar los residuos sólidos.

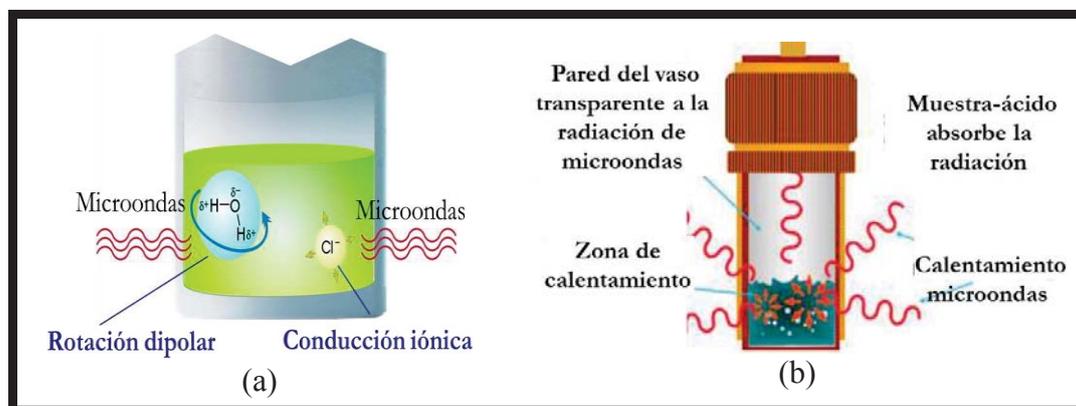


Figura 12. Extracción asistida con microondas (a) Principio de la técnica (b) Reactor

Otra técnica de extracción más novedosa es la extracción de disolventes a presión (PSE, *Pressurized Solvent Extraction*), también llamada extracción acelerada de disolventes (ASE, *Accelerated Solvent Extraction*) y/o extracción con líquidos a presión (PLE, *Pressurized Liquid Extraction*). La extracción de analitos se producen condiciones de temperatura elevada (50-200 °C) y de presión (500-3000 psi) por períodos cortos de tiempo (5-10 min). Ha adquirido cada vez más importancia como técnica de preparación en química analítica, combinando las ventajas de un alto rendimiento, la automatización y el bajo consumo de disolventes, a pesar del alto precio del equipo necesario. Se utilizan temperaturas elevadas para aumentar la solubilidad de los analitos, rotura interacciones analito-matriz y aumentar la transferencia de masa de los compuestos orgánicos al disolvente. En este procedimiento la muestra se introduce en el reactor o celda, que suele ser de acero inoxidable, que está colocado en el interior de un horno, a la temperatura adecuada de extracción y en posición vertical (figura 13). El disolvente entra en el reactor empleando una bomba con la presión determinada para mantener el disolvente líquido por encima de su temperatura de ebullición. En estas condiciones se mantiene la muestra 5 o 10 minutos, repitiendo el ciclo 1 o 2 veces con disolvente nuevo. Cuando la extracción finaliza, el extracto es arrastrado, mediante una purga con un gas inerte, hacia los viales colectores.

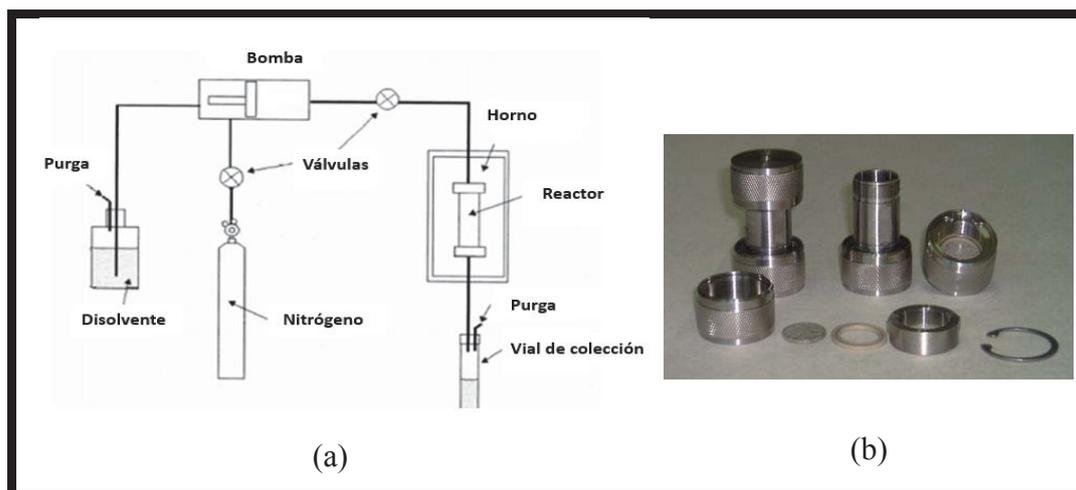


Figura 13. (a) Esquema de un sistema extractor PLE (b) celda de extracción o reactor.

En 1989 Barker desarrolló una novedosa técnica de extracción que combina los principios de varias técnicas, la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD), realizando la disrupción de la muestra mientras los componentes de la muestra se dispersan en un soporte o adsorbente sólido. Este procedimiento consta de 4 etapas muy diferenciadas, que se explican a continuación (figura 14):

- Disrupción y dispersión. La muestra (sólida, semisólida o líquida) se añade en un mortero de ágata con el agente dispersante (C_{18}) con el objetivo de conseguir una completa disrupción y dispersión de la muestra.
- Empaquetado de la columna. La columna puede estar vacía o con varias capas de adsorbentes, según si el procedimiento incluye una etapa de limpieza, simultánea a la extracción. La columna consiste en una jeringa con una frita de acero inoxidable o polipropileno, filtro de celulosa o lana de vidrio con una segunda frita encima de la muestra para la compresión.
- Elución. Esta etapa se lleva a cabo con un disolvente orgánico adecuado, donde los analitos son eluidos directamente o son retenidos en la columna y luego eluidos por otro disolvente.
- Análisis de la muestra. Principalmente para contaminantes orgánicos el empleo de técnicas cromatográficas.

El número de aplicaciones de la MSPD se ha incrementado en los últimos años debido a las ventajas que presenta como su versatilidad y la posibilidad de realizar la extracción y limpieza en una sola etapa, que son los principales atractivos del método que conducen a una reducción del tiempo dedicado a la preparación de la muestra y consumo de disolventes.

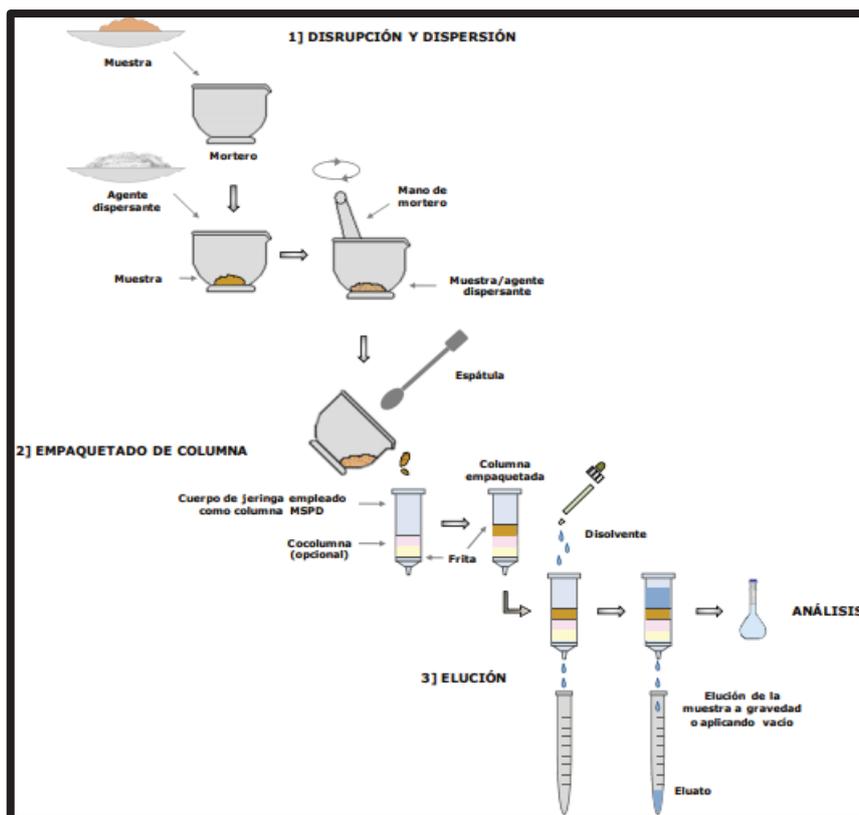


Figura 14. Dispersión de la matriz en fase sólida (Pena Sendón, 2010).

PURIFICACIÓN, LIMPIEZA O “CLEAN-UP”

Independientemente de la técnica de extracción utilizada, los extractos pueden presentar interferentes, por lo que requiere una etapa de purificación o limpieza (“*clean-up*”) con el fin de separar los analitos de los interferentes y obtener una alta recuperación del procedimiento (figura 15). Los interferentes suelen ser compuestos de alto peso molecular que imposibilitan la posterior determinación cromatográfica. Para la determinación de HAP en musgos se puede realizar la extracción en fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*), donde los analitos deben tener mayor afinidad por la fase sólida (adsorbente) que por la matriz (etapa de adsorción). El adsorbente se encuentra empaquetado entre dos fritas en una jeringa o cartucho de polipropileno, en el cual, pasan a través de él las fases líquidas por acción de la gravedad o ligera presión. Los más comunes son el octadecilsilano (C_{18}), apolar en fase inversa, y la sílice, florisil o el N-propiletildiaminosilano (PSA), polar en fase normal. Estas fases sólidas polares requieren de un proceso de activación, que consiste en eliminar moléculas de agua que bloquean los puntos polares activos del soporte sometiéndolos a altas temperaturas (300-350°C) para mejorar la reproducibilidad. (Celeiro Montero, 2015).

A continuación, los analitos retenidos en la fase sólida son eluidos por un disolvente con una gran afinidad (etapa de elución). Los objetivos principales de la SPE son eliminar interferencias presentes en la matriz junto los analitos de interés, preconcentración de la muestra y almacenamiento de analitos

inestables (Carro Díaz, 2011). Esta técnica fácilmente automatizable proporciona altas recuperaciones, se reduce la manipulación de la muestra y de disolvente, y aumenta la concentración del analito y purificación de la muestra.

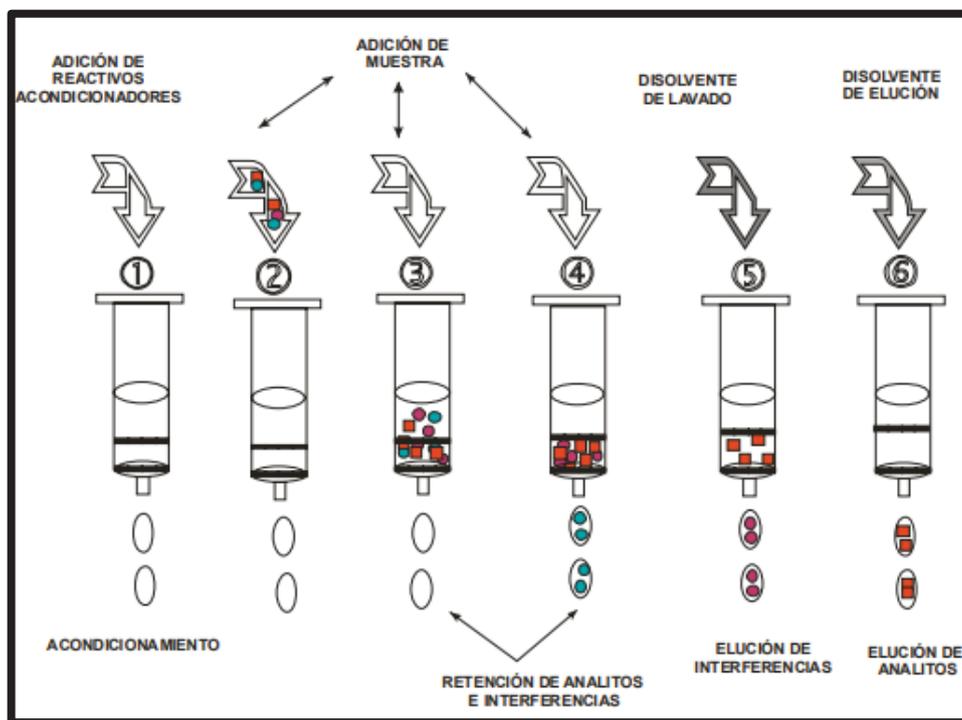


Figura 15. Principio de la SPE en la etapa de purificación o limpieza de los extractos: (1) acondicionamiento (2-4) adición de la muestra (5) separación de interferencias (6) elución de analitos (Carro Díaz, 2011).

CONCENTRACIÓN Y ENRIQUECIMIENTO DEL EXTRACTO EN ANALITO

Antes de la etapa de determinación se realiza un proceso de evaporación de disolvente con el fin de concentrar y enriquecer el extracto en el analito de interés. El método más usado es el rotavapor, que es un sistema cerrado conectado a una toma de vacío, cuyo principio de funcionamiento es la destilación a presión reducida. La disolución a concentrar, que se encuentra en un matraz redondo, este acoplado a un tubo guía de vidrio esmerilado, que rota gracias a un motor eléctrico. Al introducir el matraz en un baño de agua, en rotación constante y con una temperatura y presión adecuada, se produce la condensación del disolvente, que se recupera en el colector, debido al sistema refrigerante.

Otro método es la evaporación con corriente de nitrógeno, cuya destilación se realiza en un equipo herméticamente cerrado en el que el aire atmosférico se ha sustituido por un gas inerte mediante el uso de una línea de vacío conectada a una fuente de gas inerte, como el nitrógeno. En un proceso de evaporación asistida por gas, el nitrógeno se canaliza a través de un colector a una velocidad de flujo seleccionada que es controlada por un regulador de presión, un medidor de flujo de gas y/o válvula de aguja. La corriente de gas fluye a través de una aguja o boquilla que crea un chorro de gas que se dirige a la superficie del disolvente/muestra.

DETERMINACIÓN INSTRUMENTAL

Las técnicas cromatográficas son las más empleadas para la determinación instrumental de los HAP. Se puede emplear la cromatografía de gases (GC, *Gas Chromatography*) o la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) acopladas a diferentes sistemas de detección (figura 16).

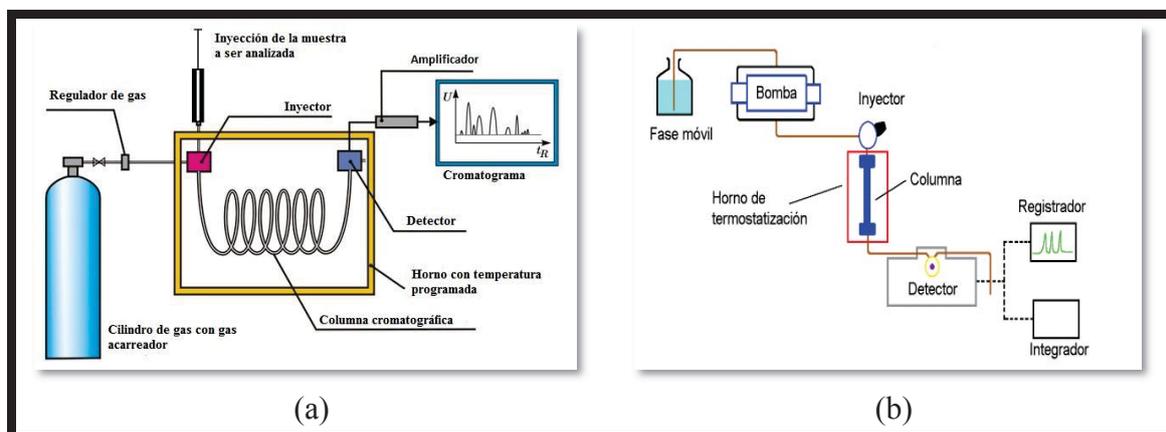


Figura 16. Esquemas de (a) cromatógrafo de gases (b) cromatógrafo de líquidos.

En GC los analitos se separan en función de la diferencia de volatilidad de los distintos analitos y su capacidad para ser absorbidos por una fase sólida. Al principio, se realiza una purga con el gas portador, desde el inyector hasta el detector. A continuación, la muestra es introducida en el inyector (150-250°C), en el cual los analitos de muestra se vaporizan, siendo transportados a la columna mediante el gas portador. Según la temperatura, naturaleza de la columna y las propiedades físicas de los analitos, éstos recorrerán a diferentes velocidades la columna, siendo eluidos a diferentes tiempos y posteriormente detectados en un sistema de detección. El detector más empleado para el análisis de HAP es el espectrómetro de masas (MS, *Mass Spectrometry*) que presenta una altísima sensibilidad debido a su altísima especificidad, además de presentar la característica de poder medir los iones con masa exacta, proporcionando información de la composición elemental, permitiendo establecer las rutas de fragmentación (Menéndez García, 2013). También se utilizan otros como el de fotoionización (PID, *Photo Ionization Detector*) o el detector de ionización de llama (FID, *Flame Ionization Detector*) pero con menor sensibilidad.

En HPLC la fase móvil es un disolvente que conduce la mezcla de analitos hacia la columna cromatográfica mediante el impulso de una bomba a presión a un flujo determinado. Dentro de la columna se encuentra la fase estacionaria y la separación de los compuestos ocurre en base a la interacción de éstos con la fase móvil y la fase estacionaria. A diferencia de la cromatografía de gases, el HPLC no está limitado por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra. Los detectores usados en la HPLC contienen celdas de flujo que permiten medir las bajas concentraciones de analito

presente en el líquido. Los más comunes son los detectores de absorción UV-Visible, detector de absorción infrarroja, detector de fluorescencia, detector acoplado a espectrómetro de masas y detector de conductividad (Ozores Belmonte, M.I.).

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es analizar cuál es la mejor estrategia de monitorización de los hidrocarburos aromáticos policíclicos con musgos y evaluar el mejor método analítico para su determinación. En concreto se compararán las diferentes especies de musgo según su morfología, capacidad acumulativa de contaminantes, factores externos, los parámetros de las diferentes estrategias de monitorización y evaluar cuál es el procedimiento analítico más adecuado para el análisis de HAP en términos de exactitud y con criterios de la química verde (mínimo impacto ambiental).

Para ello se realiza una revisión crítica apoyada en una búsqueda bibliográfica de las briofitas como biomonitores de la calidad del aire, más concretamente para la monitorización de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, así como los diferentes procedimientos analíticos para su análisis en musgos. Por lo tanto, los objetivos de este trabajo se resumen en la evaluación de la mejor especie de musgo y el mejor método (activo o pasivo) para la monitorización de la calidad del aire y discusión acerca del procedimiento analítico para la determinación de los HAP en musgos.

3. METODOLOGÍA

Se ha revisado una extensa bibliografía de: publicaciones científicas, libros, trabajos científicos (tesis doctorales, trabajos fin de grado) relacionada con la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en musgos y el uso de estos como biomonitores para la calidad del aire. Búsqueda pormenorizada en las bases de datos científicas PubMed, Scopus SciFinder, Springer y Science Direct. Las palabras clave empleadas fueron “mosses”, “HAPs”; “*bioindicator*”; “*atmospheric pollutants*”, “*moss bags*”, “*analytical methods*” entre los años 1980-2020.

Se seleccionaron las publicaciones que profundizaban la utilización de los musgos como bioindicadores, en la importancia de la vigilancia de los niveles de HAP en el aire, considerados contaminantes prioritarios con incidencia en la salud humana y medio ambiental, así como en los procedimientos analíticos más utilizados para el análisis de estos compuestos prioritarios en las muestras de musgos. Se excluyeron aquellos estudios que no ofrecían una información precisa sobre los resultados obtenidos o metodología empleada.

4. DISCUSIÓN

4.1. LOS MUSGOS COMO BIOMONITORES DE LA CALIDAD DEL AIRE

Son numerosos los estudios que han demostrado que los musgos son unos buenos biomonitores de la calidad del aire, además de ser una alternativa a los métodos físico-químicos, por ser un método simple, fiable, con una alta rentabilidad, económico y sin uso de la electricidad. Esta alternativa ha tenido tanto éxito que numerosos organismos internacionales lo utilizan para evaluar la calidad del aire y también se recogen en la norma UNE-16414.

La biomonitorización pasiva, pionera en este tipo de estudios y que utiliza musgos de la zona de estudio, presenta numerosas limitaciones que han sido solventadas con el uso de la biomonitorización activa, donde se emplean bolsas que contienen musgos trasplantados, ya que:

- Resuelve el problema de muestreo debido a la escasez o ausencia de musgo autóctono en las zonas a estudiar, por ejemplo, en zonas industriales o urbanas.
- Reduce la alta variabilidad de absorción de contaminantes que presenta el musgo nativo, ya que los musgos trasplantados son más homogéneos que el musgo autóctono (**Varela *et al.*, 2010**). Con el uso de bolsas de musgos se conoce la concentración inicial y el período de exposición, reduciendo la variabilidad temporal de los resultados. **Boquete *et al.* (2011)** encontraron una deficiente representatividad temporal de los resultados debido al alto grado de incertidumbre asociado a dicha variabilidad temporal.
- La influencia edáfica, las precipitaciones o que el musgo nativo esté cubierto se resuelve colocando las bolsas de musgo a cierta altura sobre el suelo (**Ares *et al.* 2012 y 2014; Nicola *et al.* 2013**).
- Por último, el musgo nativo se puede adaptar a la toxicidad del medio mediante mecanismos fisiológicos, pero en la biomonitorización activa el musgo no tiene tiempo de desarrollar estos mecanismos debido a los períodos cortos de exposición.

A pesar de las ventajas anteriores, la biomonitorización activa presentaba aspectos metodológicos variables a tener muy en cuenta cuando se realice el estudio, tales como: la selección de la especie de musgo, la relación peso del musgo/ superficie bolsa, tiempo y altura de exposición (**Ares *et al.* 2012**).

A la hora de seleccionar la mejor especie, hay que tener preferencia por las especies más abundantes y con amplia distribución ya que así se facilita la manipulación y la reducción de pérdida de material. Además, el musgo debe capturar de manera eficiente los contaminantes presentes en la atmósfera, lo que depende de varios factores, como la morfología de los brotes, que determina la capacidad del musgo para retener partículas, así como la circulación de gases y agua alrededor de los tejidos. Además, si se trabaja en biomonitorización activa es evidente la importancia de seleccionar una

especie para su uso estándar en las bolsas, ya que esto permitiría hacer comparaciones válidas entre los datos de vigilancia obtenidos en diferentes estudios y áreas geográficas. El musgo más utilizado para la técnica de *moss bag* han sido las del género *Sphagnum*, con unas 150-300 especies, seguido de las especies de *Hypnum cupressiforme* (Hedw.) y *Pseudoscleropodium purum* (Fleisch.), y con menos frecuencia *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. e *Hylocomium splendens* (Hedw.) Schimp.

La mayoría de los estudios que se discuten a continuación hacen referencia a su uso para monitorizar elementos traza en el aire, y son pocos los estudios que comparen las especies para la captación de compuestos orgánicos, como los HAP, por esa razón se han incluido en este trabajo ya que, a pesar de estar centrados en metales, emplean las mismas especies que en la monitorización de HAP.

Folkesson (1979) relacionó la morfología del musgo *H. cupressiforme* y de los líquenes con su capacidad acumulativa de los elementos traza (Fe, Zn, Cu, Pb, Ni y Cd) en Suecia. Fue de los primeros en concluir que los musgos presentan mayor capacidad acumulativa debido a varios factores como la localización del musgo, las características físico-químicos de los elementos traza, el intercambio catiónico y por la influencia del clima, especialmente la humedad y la velocidad del viento. También **Fernández et al. (2002)** llegaron a la conclusión de que los musgos nativos de la especie *Hypnum cupressiforme* podía retener los metales pesados más eficazmente que el *Pseudoscleropodium purum* al tener una estructura más ramificada, y, por lo tanto, presentar una mayor relación de peso/ área de superficie específica. Así, los niveles de Al, Cr, Fe, Ni y Pb fueron mayores en *H. cupressiforme*, los de Zn fueron mayores en *P. purum* y las de As, Cu y Hg fueron similares en ambas especies. Resultados diferentes fueron obtenidos en Trieste (Italia) (**Castello et al., 2007**) cuando emplearon las mismas especies (*Hypnum cupressiforme* y *Pseudoscleropodium purum*) pero en bolsas con trasplantes los musgos. La especie *P. purum* resultaba ser mejor biomonitor ya que presentaba una acumulación significativa en la mayoría de los metales debido a la morfología, probablemente a las diferentes formas de emisión y tipos de deposición atmosférica de los metales. En *P. Purum* se obtenían concentraciones más altas para Al, Fe y Pb, mientras que en *H. cupressiforme* eran mayores para Cu y Zn. Los diferentes resultados de este estudio podrían deberse a las diferentes características del material trasplantado en comparación con las muestras nativas. En el material trasplantado, el efecto de la densidad de la cubierta vegetal queda prácticamente anulado, ya que los tallos de ambos musgos están separados y poco apretados en las bolsas. También se anula el efecto de la diferente tasa de crecimiento, ya que el tiempo de exposición dura sólo algunas semanas y la vitalidad del musgo en los trasplantes se ve muy afectada. Las mayores concentraciones de metales y la menor pérdida de casi todos en el *P. purum* trasplantado sugieren que en las bolsas de musgo las hojas más anchas y menos apiñadas de este musgo podrían ser más eficientes para interceptar la deposición atmosférica, especialmente en forma de partículas, que la alcanzada con las hojas pequeñas y muy

amontonadas de *H. cupressiforme*. Otros autores empleaban otras especies como las del género *Sphagnum*, así **Temple et al. (1981)** y posteriormente **Ares et al. (2012)** consideraron que las especies del este género eran las más adecuadas ya que son capaces de acumular mayores cantidades de contaminantes que otras especies comúnmente utilizadas debido a sus características morfológicas y fisiológicas. En la especie *Sphagnum*, las hojas constituyen alrededor 67 % de biomasa seca, por lo que constituye una gran superficie específica, además de tener unas hialocistes con grandes poros que atrapan las partículas en el aire. Esta capacidad de retención también se debe a la capacidad de intercambio catiónico (CEC), principalmente vinculada a la cantidad de ácidos urónicos (y a su grado de metilación) en la pared celular. **Temple et al.** indicaban que el género *Sphagnum* presenta una mayor capacidad de intercambio catiónico, 0,9-1,5 mol/g de peso seco, lo cual es superior al resto de los musgos que oscila entre 0,6-1,1 mol/g. Posteriormente, **Richter y Dainty (1989)** encontraron que en el musgo nativo *Sphagnum russowii*, presentaban una mayor capacidad de intercambio catiónico debido a los ácidos galacturónicos. Debido a la acción de la enzima pectín esterasa se liberan los grupos metoxilo de los residuos de ácido galacturónico de las pectinas, dando lugar a pectatos y a metanol, dejando libres los sitios de intercambio catiónico de la pared celular. Más adelante **Culicov y Yurukova (2006)** realizaron un estudio comparativo de los musgos *Sphagnum girgensohnii* e *Hypnum cupressiforme* según el factor de acumulación relativa de cada especie, que fueron expuestos en las mismas condiciones en la ciudad de Sofía entre octubre de 2001 y enero de 2002. Ambas especies son buenos acumuladores de metales, pero llegaron a la conclusión de que el *Hypnum cupressiforme* parecía ser menos adecuado para la monitorización ya que presentaba el factor de acumulación relativa (FAR), más bajo para 20 de los 34 elementos, en comparación con el *Sphagnum*. El factor de acumulación relativa (FAR), es el incremento en la concentración de elemento calculado según la siguiente ecuación: $(C_{final} - C_{inicial})/C_{inicial}$. Los elementos trazas que presentan factor de concentración mayor de 1 en el *Sphagnum girgensohnii* son: el Cd, I, V con FAR de 1,32; 2,76 y 1,33, respectivamente mientras que en el *Hypnum cupressiforme* son el I y Cl con de 1,11 y 2,24, respectivamente.

Para reducir la variabilidad que existe entre la capacidad acumulativa de los diferentes contaminantes entre las diferentes especies y la variabilidad dentro de una misma especie en función de su crecimiento, **Capozzi et al. (2017)**, realizaron el primer estudio para calcular el rendimiento en la acumulación de elementos traza por un musgo clonado en comparación con uno nativo. Así, compararon un clon de *Sphagnum palustre* L. con el *Pseudoscleropodium purum* Hedw. nativo. El *S. palustre* se enriqueció significativamente en diez elementos (Al, Ba, Cr, Cu, Fe, Hg, Pb, Sr, V y Zn) de doce analizados, mientras que el *P. purum* se enriqueció sólo en seis de ellos (Al, Ba, Cu, Hg, Pb y Sr). Por lo tanto, el clon demostró ser más sensible en cuanto a la adsorción de metales y mostró un

mejor rendimiento como bioacumulador, proporcionando una señal de acumulación más alta y un excelente rendimiento de adsorción, que son características clave para la mejora de la técnica de las bolsas de musgo y su aplicación a gran escala. Además, indicó que el clon representa un biomaterial que pasa por alto el paso de la recolección de musgo y los tratamientos de pre-exposición.

Los conocimientos de la biomonitorización de elementos traza se utilizan para la aplicación de los musgos a la determinación de compuestos orgánicos. Así, **Krommer et al. (2007)**, **Foan et al. (2010)**, **Holoubek et al. (2000)** indicaron que las briofitas (concretamente, *H. cupressiforme* y *P. purum*), debido a su constitución morfológica y fisiológica, como su falta de enraizamiento más una cutícula persistente, hacen a los musgos herramientas indispensables en el campo de la vigilancia de los contaminantes orgánicos, ya que la absorción de agua, nutrientes y sustancias tóxicas se produce predominantemente a través de la deposición atmosférica. Además, presentan una alta capacidad de intercambio catiónico y la relación superficie/volumen favorece la acumulación de grandes cantidades de contaminantes orgánicos. Un ejemplo de cómo afectan las condiciones meteorológicas y la topografía lo realizaron **Zechmeister et al. (2006)** que llevaron a cabo un estudio usando el musgo *Hylocomium splendens* como bioindicador en el interior de un túnel, para evaluar la contaminación atmosférica causada por el tráfico; también emplearon los musgos que crecen de forma natural a lo largo de carreteras muy frecuentadas, teniendo en cuenta las condiciones meteorológicas. Los resultados obtenidos indican que la concentración dentro del túnel fue de $\Sigma\text{HAP} = 4100 \pm 2458$ ng/g y fuera de este de $\Sigma\text{HAP} = 1960 \pm 2352$ ng/g, concluyendo que al igual que en los campos abiertos, los musgos son indicadores adecuados para controlar las emisiones del tráfico en los túneles, ya que se minimizan variables como otras fuentes de contaminación y el "ruido" en el proceso de acumulación, como el lavado a través de la deposición húmeda. **Dolegowska y Migaszewski en 2011**, también realizaron un estudio comparativo de la capacidad de concentración de HAP con otras especies como *Pleurozium schreberi* Brid. e *Hylocomium splendens*. Este último mostró mayores concentraciones en la mayoría de los HAP (excepto en el DBahA). Esta mejor capacidad de bioacumulación observada en *H. splendens* se explicó por diferencias en la morfología entre las dos especies de musgo, ya que *H. splendens* presenta hojas plumosas y segmentos anuales muy desarrollados; es decir, cada año presenta un nuevo nivel que le permite a la especie "trepar" sobre otros musgos, mientras que *P. schreberi* está ramificado y tiene hojas más pequeñas. Otro factor a tener en cuenta es la altura de exposición que influye en los resultados muy variables debido a la dispersión de los contaminantes en la atmósfera, que se ve afectada, por ejemplo, por las condiciones meteorológicas, fuentes de emisión o topografía de la zona (presencia de muros o edificios). Hay estudios que investigan la influencia de la altura de exposición en la biomonitorización del aire como por ejemplo el de **Nicola et al. (2013)**, no encontró diferencias significativas de concentración de

HAP entre los trasplantes de *H. cupressiforme* expuestos a alturas de 3, 6 y 9 m en Nápoles, pero observó una mayor concentración de un lado que de otro, debido al efecto de la dirección del viento predominante que implica una exposición diferente, concluyendo que esta distribución uniforme vertical podría ser por las turbulencias de aire. En resumen, aunque encontremos resultados muy variables según la altura de exposición, se debe establecer una altura para estandarizar este factor. **Ares et al., (2012 y 2014)** recomiendan una altura de 4 metros, aunque las alturas de exposición más reproducibles son entre 2,5 y 4 metros, aunque dependerán del objetivo a estudiar.

El tiempo de exposición también es otro factor muy variable que depende de condiciones externas como las diferencias en los niveles atmosféricos de los contaminantes durante los distintos períodos de exposición o las condiciones meteorológicas que pueden afectar a la disponibilidad de los contaminantes en el aire. **Ares et al. 2014** concluyeron que las concentraciones obtenidas de metales para los períodos de exposición (4, 8 y 12 semanas) del musgo estudiados aumentaban en general con el tiempo pero que había algunas excepciones que indican que esta tendencia no es igualmente robusta en todos los casos. Así seleccionaron tiempos de exposición de la “moss bag” de 8 semanas similar a los estudios previos de Gailey y Lloyd (1986) que encontraron los valores más altos de reproducibilidad para 8 semanas de exposición. Por último, el tamaño de la bolsa determina la relación entre el peso del musgo y la superficie de la bolsa. Esta relación afectará a la eficiencia con la que los trasplantes capturan los contaminantes de la atmósfera. Así a menor peso del musgo, es más susceptible la deposición de partículas, pero las concentraciones de elementos son más homogéneas para un mayor peso de musgo, ya que la mayor parte del musgo no ha sido expuesto a la atmósfera, porque la mayoría de los brotes están completamente comprimidos, y por ello la concentración de elementos traza es más similar a las concentraciones iniciales. Por lo tanto, concluye que una solución intermedia es la relación peso del musgo/superficie de la bolsa de 5,68 mg·cm² como un compromiso entre la señal de contaminación y la reproducibilidad de los datos.

Capozzi et al. (2017) realizaron un estudio comparativo sobre la correlación entre las concentraciones de HAP en los musgos y otras especies vegetales bioindicadoras. En una zona urbana/rural investigó el uso conjunto de dos enfoques de biomonitorización diferentes: las hojas de árboles autóctonos *Robinia pseudacacia L.*, y el musgo *Hypnum cupressiforme Hedw.* trasplantado en bolsas. Son muchos los factores que pueden contribuir en distinta medida a la acumulación de HAP, dependiendo del compuesto específico y de las especies utilizadas como biomonitores. La cantidad de HAP ligeros (2-3 anillos) en *R. pseudoacacia* fue aproximadamente dos veces superior a la observada en los trasplantes de *H. cupressiforme*; sin embargo, para los HAP de 4 anillos, los contenidos en el musgo fueron mayores que en las hojas de los árboles. Una situación más heterogénea ocurre cuando se consideran los HAP de 5 y 6 anillos, cuya acumulación fue en algunos

casos mayor en el musgo y en otros en las hojas (figura 17). En conclusión, los perfiles de HAP en los dos biomonitores no están correlacionados, confirmando la diferente capacidad de acumulación de las dos matrices biológicas. El experimento realizado en este estudio demostró el potencial de los trasplantes desvitalizados de *H. cupressiforme* y *R. pseudoacacia* como biomonitores adecuados para la evaluación de la presencia de HAP en el aire.

Después de esta discusión, se puede concluir que cualquier género es válido para los estudios de la calidad del aire, teniendo en cuenta que cada especie captura de diferente manera los contaminantes presentes en la atmósfera, por lo que es un factor importante a la hora de realizar un estudio. Con esto, las numerosas variables como la diferente capacidad de las especies de acumular contaminantes, la disponibilidad del musgo natural y

no contaminado y según donde se realice el estudio hace muy difícil realizar estudios comparativos de niveles de concentración de contaminantes. Por ello, si se dispusiera de una única especie de uso generalizado facilitaría una comparación directa entre diferentes estudios de biomonitorización, por lo que surge el proyecto europeo "MOSSclone" (www.mossclone.eu) que desarrolló un protocolo estandarizado para la técnica *moss bag*, utilizando un clon de musgo desvitalizado como sensor pasivo de contaminantes (metales y HAP). El aspecto de la clonación es quizás el más crucial en lo que respecta al establecimiento de una metodología normalizada. De las cinco especies ensayadas: *Sphagnum fimbriatum* Wils. y Hook., *Sphagnum magellanicum* Brid., *Sphagnum palustre* L., *Sphagnum rubellum* Wils. y *Sphagnum subnitens* Russ. y Warnst., finalmente se seleccionó la especie *Sphagnum palustre* L. por sus propiedades físicas y químicas y un crecimiento rápido y fácil de ser clonado en biorreactores (Beike *et al.*, 2015). De hecho, el uso de musgos recogidos en la naturaleza implicaba un impacto ambiental y está sesgado por una variabilidad intrínseca en términos de composición elemental y química del biomonitor, lo que produce una elevada variabilidad de los datos lo que conlleva un alto grado de incertidumbre en la interpretación de los resultados.

Concha Graña *et al.* (2015a) indicaban que el uso de un clon de musgo para la biomonitorización de contaminantes presenta numerosas ventajas sobre el uso de musgo nativo, principalmente en la reproducibilidad en las características físicas. El material obtenido es homogéneo, estandarizado y

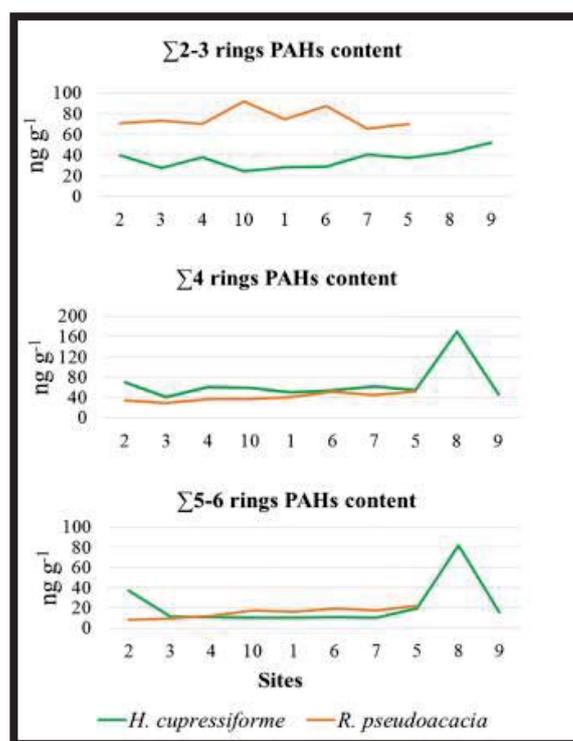


Figura 17. Comparación entre el contenido de HAP entre el *H. cupressiforme* y *R. pseudoacacia*

con una concentración inicial de HAP inferior a la del musgo cultivado en el campo, lo que permite su uso para la monitorización de áreas no contaminadas. Además, algunos estudios desarrollados en el proyecto Mossclone mostraron que el *Sphagnum palustre in vitro* presenta, en general, características morfológicas similares al material recogido en el campo, aunque de menor tamaño. Este hecho sugeriría una mayor relación superficie-masa del material del moss clone como posible beneficio para el propósito de biomonitorización.

Por último, **Aboal et al. (2020)** evaluaron los niveles atmosféricos de HAP recogidos en el *Mossphere*[®], con el fin de conocer la eficacia de este dispositivo, comparándolo con los métodos convencionales de deposición atmosférica (colectores de embudo) y de la recogida de materia particulada PM₁₀ (muestreadores de volumen de aire). Se expusieron en diferentes lugares con grados de contaminación y zonas climáticas diferentes. Con los resultados obtenidos por *Mossphere*[®], pudo explicar la variabilidad de los resultados obtenidos con otras técnicas y la utilidad potencial de esta tecnología innovadora para cartografiar los niveles de HAP. Además, debido a la robustez de la *Mossphere*[®], sugirió la inclusión del dispositivo en los programas gubernamentales de gestión medioambiental.

4.2. DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN MUSGOS

En la siguiente tabla 7 se resumen los diferentes procedimientos analíticos empleados para la determinación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en musgos (nativos o trasplantados) y que han sido extraídos de la revisión bibliográfica realizada y que a continuación se procederá a su discusión, en lo que se refiere, a las especies de musgo y el tipo de monitorización empleado y al método de análisis empleado para la determinación de los HAP, incluyendo cada una de las etapas del análisis.

Wegener et al. (1992) fueron pioneros en determinar los HAP en musgos trasplantados (biomonitorización activa). La mayoría de los estudios previos empleaban el musgo para la monitorización de elementos traza en el aire, siendo escasos los estudios con contaminantes orgánicos. Los autores hicieron uso de *Sphagnum sp.* para estudiar la influencia que una fábrica de aluminio tenía en perímetro de 1 km a su alrededor, en comparación a una zona relativamente limpia. Realizaron una extracción Soxhlet con acetonitrilo durante un tiempo largo de 24 horas para posteriormente concentrar el extracto en un sistema Kuderna-Danish y determinar 6 HAP por cromatografía de líquidos con detector de fluorescencia. Los resultados obtenidos indicaron que las concentraciones de HAP en las bolsas de musgo expuestas cerca de la planta de aluminio eran 30 veces mayores (Fl: 12950 ng/g; BbF: 1555 ng/g; BkF: 723ng/ g; BaP:1004 ng/g; BghiP:1067 ng/g;

IP: 3245 ng/g) que en las zonas rurales (Fl: 448 ng/g; BbF: 62 ng/g; BkF: 22ng/g; BaP:26 ng/g; BghiP: 46 ng/g ;IP: 230 ng/g). Con esto concluyó que la monitorización activa con musgos era una poderosa herramienta para rastrear concentraciones elevadas de HAP en el aire, sin un coste elevado de muestreo. **Holoubek et al. (2000)** analizaron muestras de *Hypnum cupressiforme* nativo recogidas entre 1988-1994 en la región de Kosietice (República Checa) y cerca de dos fuentes industriales, que someten a un secado parcial en estufa (24 h, temperatura ambiente) antes de la extracción Soxhlet que realizan en un tiempo de 8 horas con DCM. Utilizan el evaporador rotatorio (rotavapor) en un baño a 45°C para concentrar el extracto. Emplean Florisil® como adsorbente y HEX y DCM como disolventes de elución en la etapa de purificación del extracto mediante SPE antes de la determinación cromatográfica de 16 HAP por cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas. La media y el rango de concentraciones de HAP varió entre los niveles más bajos en la región de Kosietice (0,3-4700 (\bar{x} =609) ng/g de peso seco) y los niveles más altos en las zonas industriales (229-10222 (\bar{x} =3060) y <0,3-16730 (\bar{x} =3670) ng/g) observándose una gran diferencia de concentración según la localización. **Zechmeister et al. (2006)**, también realizaron un estudio con *Hylocomium splendens* combinando el uso de bolsas de musgo con los musgos nativos con el fin de evaluar la contaminación atmosférica producida por el tráfico dentro de un túnel y fuera de éste. Tras la exposición, las muestras se liofilizaron y extrajeron con extractor Soxhlet y HEX. El extracto se concentró en corriente de nitrógeno en sistema automático TurboVap® (35 minutos, 1 bar y 35°C) con una posterior limpieza con SPE y elución de los HAP con una mezcla de DCM- éter de petróleo (1:4 v:v), para su posterior análisis por GC-MS. Observaron que las concentraciones dentro del túnel eran más del doble de las encontradas en su exterior, con rangos de Σ HAP= 4100 ± 2458 ng/g y Σ HAP=1960 ± 2352 ng/g, respectivamente. **Krommer et al. (2007)** evalúan el nivel de contaminación por 16 HAP en el aire de la reserva de la biosfera de Wienerwald (Austria) empleando musgos autóctonos de la especie *Scleropodium purum*. Realizan también una extracción Soxhlet empleando solamente HEX como disolvente de extracción. La concentración del extracto la realizan en corriente de nitrógeno, empleando un sistema automático Turbo Vap (35 min, 1 bar y t 35 °C). Al igual que Houlebeck et al. utilizan la SPE con florisil como adsorbente y una mezcla de diclorometano y éter de petróleo (1:4) para la etapa de limpieza o “clean up” del extracto. Realizan una etapa de concentración o enriquecimiento en analito del eluato antes de su análisis por GC-MS. Los rangos de concentración oscilaron entre 120-730 ng/g de Σ HAP. La extracción Soxhlet con HEX y DCM también fue utilizada por **Foan et al. (2010)** que emplearon el musgo *Hypnum cupressiforme* Hedw., recogido entre 1879-1881, 1973-1975 y 2006-2007 y conservados en el Herbario de la Universidad de Navarra, para investigar los cambios históricos de la deposición atmosférica de HAP en el norte de España. La etapa de limpieza sigue siendo SPE con florisil y elución con DCM. Finalmente

emplean la cromatografía de líquidos de alta presión acoplada a la detección por fluorescencia (HPLC-FLD) para la determinación de los HAP en los musgos. La exactitud fue evaluada mediante el estudio de recuperación analítica obteniendo valores entre el 25% y el 71% (\bar{x} =54%) para los HAP más ligeros (Ace a Pyr) y entre el 27% y el 79% (\bar{x} =60%) para los HAP pesados (BaA a IP). Los niveles de HAP analizados en cada siglo fueron de 783-2009 ng/g en el siglo XIX, de 206-465 ng/g en siglo XX y de 86-373 ng/g en siglo XXI. Concluyeron que las altas concentraciones de HAP del siglo XIX es debido a la producción histórica de carbón vegetal para las fundiciones locales y con el uso exclusivo de estufas de leña, pero la desaparición de las carbonerías y las fundiciones a finales del siglo XIX, junto con la evolución de la calefacción doméstica, ha sido una de las causas más importantes de la desaparición del carbón vegetal, y por ello la disminución de concentración a lo largo de los siglos XX y XXI. **Dolegowska y Migaszewski (2011)** confirman lo comentado en capítulos anteriores de la diferente capacidad de captación/acumulación de contaminantes por parte de diferentes especies de musgos. Así, estudiaron musgos nativos de las especies *Hylocomium splendens* y *Pleurozium schreberi* en 10 sitios diferentes de Polonia. Los rangos de concentración de los diecisiete HAP determinados fueron mayores en *H. splendens* (558- 4457 ng/g) que en *P. schreberi* (643-3086 ng/g). En ambas especies de musgo predominaron el Phe (75-732 mg/kg), el Ft (101-577 mg/kg) y el Pyr (68-568 mg/kg). También, **Colabuono et al. (2015)** realizaron un estudio de evaluación atmosférica después de un gran incendio sucedido en una estación militar de Brasil. Se realizaron dos campañas de muestreo con los musgos *Sanionia uncinata* y *Warnstorfia sarmentosa* recogidos en el área afectada: la primera fue en marzo de 2012, menos de un mes después del incendio, y la segunda en diciembre de 2012, ocho meses después de dicho suceso. La muestra, una vez seca, se extrae en Soxhlet durante 8 horas con una mezcla hexano/diclorometano (1:1, v/v). La etapa de limpieza la realizan con una mezcla de gel de sílice y alúmina, y elución con mezclas más polares (DCM) antes de la determinación cromatográfica (GC-MS). Las concentraciones de HAP totales oscilaron entre 131-1235 ng/g (mes siguiente al incendio) y 126- 254 ng/g (ocho meses después del incendio) observando una disminución de concentración de HAP desde marzo a diciembre debido a que los HAP se depositan en el musgo, y son liberados posteriormente por lavado, evaporación y/o degradación.

Tabla 7. Procedimientos de análisis de HAP en musgos (continúa).

Analitos	Especie	Lugar	Pretratamiento	Extracción	Concentración / Purificación	Técnica	Recuperación (%)	Sensibilidad (ng/g)	Niveles (ng/g)	Cita
6 HAP	<i>Sphagnum</i> sp (bolsa, activo).	Holanda	Secado en estufa	Soxhlet, 24h ACN	Kuderna-Danish SPE (sílice, HEX+ DCM/ pentano (15:85))	HPLC-FI	-	-	Cerca de fábrica (723-12950) Lejos de fábrica (22-448)	Wegener <i>et al.</i> (1992)
16 HAP	<i>Hypnum Cupressiforme</i> (nativo, pasivo)	República Checa	Secado, 24h (T ambiente)	Soxhlet, 8h DCM	Rotavapor (45°C) SPE (florisil, DCM)	GC-MS	80-98	LDD (0,1)	609 en Kostičice 3057 en Valašské 3670 en Vrřesova	Holubek <i>et al.</i> (2000)
16 HAP	<i>Hylocomium splendens</i> (bolsa, activo)	Austria	Liofilización	Soxhlet HEX	TurboVap (35 min, 1 bar, 35°C) SPE (DCM y etér de petróleo)	GC-MS	50-114	-	4100 (dentro del túnel) 2352 (fuera del túnel)	Zechmeister <i>et al.</i> (2006)
16 HAP	<i>Scleropodium purum</i> (nativo, pasivo)	Austria	Liofilización	Soxhlet HEX	TurboVap (35 min, 1 bar, 35°C) SPE (DCM y etér de petróleo)	GC-MS	46-103	-	120-730	Krommer <i>et al.</i> (2007)
13 HAP	<i>Hypnum Cupressiforme</i> (nativo, pasivo)	España	Secado estufa (30°C) Homogenización	Soxhlet HEX, DCM)	SPE (florisil, DCM)	HPLC-FI	54-60	LDC (0,3- 5,3)	783-2009 (s. XIX) 206-464, (s. XX) 86-372 (s. XXI)	Foan <i>et al.</i> (2010)
17 HAP	<i>Hylocomium splendens</i> <i>Pleurozium schreberi</i> (nativo, pasivo)	Polonia	Lavado Secado Homogenización	Soxhlet, DCM	Evaporador TurboVap	GC-MS	74-96	-	558-4457 (<i>H. splendens</i>) 643-3086 (<i>P. schreberi</i>)	Dolegowska y Migaszewski, (2011)
19 HAP	<i>S. uncinata</i> <i>W. sarmentosa</i> <i>Brachitecium</i> sp. <i>Syntrichia princeps</i> (nativo, pasivo)	Brasil	Secado	Soxhlet, 8h DCM/HEX (1:1 v/v)	SPE (alúmina + sílice; DCM/HEX (1:1 v/v))	GC-MS	67-115	LDC (1,14 - 10,3)	457-544 955 126-254	Colabueno <i>et al.</i> (2015)

Tabla 7. Procedimientos de análisis de HAP en musgos (continúa).

Análitos	Especie	Lugar	Pretratamiento	Extracción	Concentración / Purificación	Técnica	Recuperación (%)	Sensibilidad (ng/g)	Niveles (ng/g)	Cita
16 HAP	<i>Hypnum cupressiforme</i> (nativo, pasivo)	Hungría	Liofilización	Ultrasonidos HEX	SPE (silice, DCM)	HPLC-UV	65-85	-	1567-10450	Otvos <i>et al.</i> (2004)
16 HAP	<i>H. cupressiforme</i> (bolsa, activo)	Italia	Secado al aire Homogeneización	Ultrasonidos DCM: ACE (1:1 v/v)	Rotavapor Filtración con PTFE Corriente de nitrógeno	GC-MS	70	LDD (2,0)		Nicola <i>et al.</i> (2013)
16 HAP	<i>Sphagnum girg.</i> <i>H. cupressiforme</i> (bolsa, activo)	Belgrado	Secado al aire Homogeneización	Ultrasonidos (DCM, 3x5 min)	Rotavapor	GC-MS	90-100	LDD (1,40)	42 - 178 (<i>S.girgensohni</i>) 80-249 (<i>H.cupressiforme</i>)	Vukovic <i>et al.</i> (2015)
16 HAP	<i>H. cupressiforme Hedw</i> (bolsa, activo)	Italia	-	Ultrasonidos, (DCM, 20 min)	SPE (silice, DCM)	GC-MS	82-120	-	80 - 294	Capozzi <i>et al.</i> (2017)
16 HAP	<i>P. purum</i> (nativo, pasivo)	España	Lavado Secado en estufa Homogeneización	MAE (30 min, 130°C) HEX:ACE (1:1)	SPE (florisil+silice, DCM:HEX) Rotavapor (45°C)	GC-MS	90 (Naf=60)	LDC (9,1.10 ⁻⁵ -0,014)	360	Ares <i>et al.</i> (2009)
16 HAP	<i>P. purum</i> (nativo, pasivo)	España	Secado estufa (80°C) Homogeneización	MAE (HEX/ACE)	SPE (florisil y silice) Rotavapor	GC-MS	90 (Naf=60)	LDC (9,1.10 ⁻⁵ -0,014)	5-862	Ares <i>et al.</i> (2011)
19 HAP	<i>P. purum</i> <i>Sphagnum</i> <i>H. cupressiforme</i> (nativo, pasivo)	España	Lavado Secado estufa (45°C) Homogeneización	MAE (16 min., 80°C) HEX:ACE (9:1)	SPE (florisil+silice; DCM:HEX,(20:80) Evaporador Syncore	GC-MS	83-108	LDD (0,05-0,81) LDC (0,15-1,70)	1,6 - 12,2 (<i>P. purum</i>) 0,1-24 (<i>H. cupressiforme</i>) 23-0,4 (<i>Sphagnum sp</i>)	Concha- Graña <i>et al.</i> (2015a)

Tabla 7. Procedimientos de análisis de HAP en musgos.

Analitos	Especie	Lugar	Pretratamiento	Extracción	Concentración Purificación/	Técnica	Recuperación (%)	Sensibilidad (ng/g)	Niveles (ng/g)	Cita
16 HAP	<i>H. plumaeformae</i> (nativo, pasivo)	China	Lavado Secado al aire Homogeneización	ASE (1500 psi, 100°C, 2 ciclos, 10 min; DCM:ACE (1:1))	Rotavapor SPE (alúmina+ sílice+ florisil, DCM)	GC-MS	40-101	LDD (3,3-7,8)	310-1210	Liu <i>et al.</i> (2005)
16 HAP	<i>H. splendens</i> <i>P. schreberi</i> (nativo, pasivo)	Polonia	Lavado Secado, 24h (T ambiente) Homogeneización	ASE DCM	Evaporación corriente de nitrógeno	GC-MS	74-96	-	512 (<i>H. splendens</i>) 434 (<i>P. schreberi</i>)	Galuzska (2007)
13 HAP	<i>H. Cupressiforme</i> <i>Hylaconium splendens</i> (nativo, pasivo)	España	Liofilización Homogeneización	PLE (5-15 min, 150 bar, 80-140 °C, 1-3 ciclos) HEX	SPE (sílice, HEX:DCM (60:40))	HPLC-FL	68-70	-	233 ± 6	Foan <i>et al.</i> (2012)
19 HAP	<i>Hylaconium Splendens</i> (nativo, pasivo)	Groenlandia	Homogeneización	ASE (1500 psi, 14 min, 100°C) pentano:DCM (90:10)	SPE (sílice, Pentano: DCM (90:10))	GC-MS	100	LDD (2,0-26,4) LDC (5,4- 75,1)	240-781	Stawson <i>et al.</i> (2020)
20 HAP	<i>Sphagnum Palustre L</i> (clon.y Mossphere, pasivo) <i>Sphagnum Palustre L.</i> <i>Hypnum cupressiforme</i> (nativo, pasivo)	España	Secado estufa, 24h, (40°C) Homogeneización	MSPD 3min, C ₁₈	SPE (florisil, HEX DCM- (20:80))	PTV-GC- MS/MS	84-116	LDD (<2) LDC (0,10- 1,10)	<0,20-39 0,6-58	Concha-Graña <i>et al.</i> (2015b)
15 HAP	<i>Sphagnum palustre L.</i> (clon y Mossphere®) pasivo)	Italia y España	Secado estufa, 24h, (40°C) Homogeneización	MSPD 3min, C ₁₈	SPE (florisil, HEX DCM- (20:80))	PTV-GC- MS/MS	-	-	-	Aboal <i>et al.</i> (2020)

La extracción sólido líquido asistida con ultrasonidos es otra técnica convencional que se ha usado para la determinación de estos compuestos en musgos que necesita menos tiempo para una extracción eficiente de los HAP que la extracción Soxhlet. Así, **Otvos et al. (2004)**, realizan un estudio con *Hypnum cupressiforme* autóctono para monitorizar las concentraciones de HAP en Hungría. La muestra se extrae con HEX-ACE (1:1 v/v) en un baño ultrasonidos concentrando el extracto obtenido en rotavapor. La limpieza del extracto se realiza por SPE (sílica) aislando 16 HAP con una elución con DCM y la determinación instrumental final se realiza por HPLC-UV. El método aplicado es exacto con un rango de recuperación analítica para los 16 HAP entre 65-85%. y el rango de concentración de HAP obtenido en todo el país ha sido entre 1567-10450 ng/g (\bar{x} =1870). Al final del estudio concluyen que *Hypnum cupressiforme* acumula hidrocarburos en concentración más alta que otras especies de vegetación ya que es una especie densa que presenta una forma de mata y por lo tanto los acumula de manera más efectiva.

Nicola et al. (2013) realizaron una evaluación de la concentración de HAP expuestos a diferentes alturas: 3,6 y 9 metros. Las bolsas de musgo expuestas de *Hypnum cupressiforme* fueron lavadas y secadas al aire ambiente previa extracción por ultrasonidos, usando una mezcla de DCM/ACE (1:1, v/v) durante 3 minutos. Para la concentración del extracto emplean un rotavapor seguido de evaporación a sequedad en corriente de nitrógeno. Mediante la determinación por GC-MS, la concentración mínima detectable fue de 2 µg/g para cada HAP analizado. La concentración a diferentes alturas fue muy similar, sin embargo, se observaba un gradiente de concentración en función de la dirección del viento predominante durante el muestreo y que la distribución uniforme vertical podría deberse a las turbulencias de aire. Posteriormente, **Vukovic et al. (2015)** aplicaron por primera vez la tecnología de las bolsas de musgo en el área urbana de Belgrado (Serbia) utilizando dos especies: *Sphagnum girgensohnii* Russow e *Hypnum cupressiforme* Hedw. El objetivo del estudio era probar si ambas especies de musgos se podían utilizar indistintamente para la biomonitorización de contaminantes atmosféricos. Para ello, hicieron muestreos simultáneos con las dos especies de musgo que posteriormente sometieron a una extracción por sonicación con DCM durante 5 minutos, sin etapa de purificación del mismo, solamente una filtración y posterior concentración, obteniendo recuperaciones analíticas satisfactorias (90-100%) para los 16 HAP analizados. Las concentraciones de HAP encontradas en *S. girgensohnii* (42-178 ng/g) fueron ligeramente inferiores a las que presentaban las muestras de *H. cupressiform* (80-249 ng/g). Los HAP más comunes encontrados en las muestras de musgo incluyen Naph, Phe, Fl, Pyr, Chry, BbF, BkF, BaP e IP. Como conclusión del estudio se pueden distinguir claramente las zonas urbanas de alta, moderada y baja contaminación, confirmando que las bolsas de musgo pueden ser usadas como una potencial herramienta para evaluar la contaminación del aire. **Capozzi et al. (2017)** estudiaron la correlación entre las concentraciones

de HAP entre las hojas de árboles autóctonos de *Robinia pseudacacia L.* y los musgos *S. girgensohnii* e *Hypnum cupressiforme* presentes en una misma área. Las muestras, después de una homogenización previa se extrajeron mediante ultrasonidos con DCM durante 25 minutos. Los extractos se purificaron a través de gel de sílice activado y se concentraron bajo una suave corriente de nitrógeno. El contenido total de HAP varió entre 42 y 178 ng/g y 80 y 249 ng/g para *S. girgensohnii* y *H. cupressiforme*, respectivamente. En ambas especies de musgo, los HAP de bajo peso molecular más abundantes fueron Naph, Phe, Fl, Pyr y Chry y los HAP de alto peso molecular más abundantes fueron BbF, BkF, BaP e IP.

Otra de las técnicas de extracción más eficientes y rápidas es la extracción asistida por microondas (MAE) que fue aplicada por **Ares et al. (2009)** en estudios de biomonitorización con musgos nativos en Galicia con la especie *Pseudoscleropodium purum* para detectar fuentes de contaminación a pequeña escala. Las muestras se almacenaron congeladas a -30 °C y a temperatura ambiente (después del secado). La extracción se realizó en un horno de microondas durante 30 minutos a 130 °C con una mezcla de HEX-ACE (1:1). Después del filtrado de los extractos, éstos se purificaron con SPE empleando una mezcla adsorbente de florisil® y gel de sílice, antes de su inyección en GC-MS/MS. El porcentaje medio de recuperación fue superior al 90% para todos los HAP, excepto para el naftaleno, que fue del 60%, debido a su volatilidad y la sensibilidad, evaluada como límite de cuantificación, varió entre $9,1 \cdot 10^{-5}$ ng/g para los HAP más pesados y de 0,014 ng/g para Naf. Como conclusión del estudio se observó que la concentración del contaminante es elevada en las inmediaciones de la fuente y disminuye rápidamente al aumentar la distancia debido a que estos son compuestos semivolátiles y muestran una afinidad por las partículas en suspensión, por lo que pueden desplazarse cientos de km de la fuente de emisión, teniendo en cuenta que haya condiciones meteorológicas que lo favorezcan. Los mismos autores, años más tarde, **Ares et al. (2011)** emplearon el mismo procedimiento de análisis para estudiar los patrones de dispersión de contaminantes en entornos urbanos situados en una zona de la ciudad de Santa Cruz de Tenerife, en un área próxima a una zona industrial y en un área de denso tráfico. Concluyeron que la biomonitorización activa con musgos es una técnica ideal para entornos urbanos e industriales, que permite, de forma fácil y económica, el establecimiento de una densa red de muestreo y determinación simultánea de la concentración de HAP, considerándolo una técnica de control ambiental muy útil. **Concha-Graña et al. (2015a)** también aplican MAE para la determinación de 19 HAP en muestras de musgo. El estudio se realiza en Galicia con el fin de conocer el nivel de fondo de HAP recogiendo las muestras de musgo (*Pseudoscleropodium purum*) en zonas alejadas de la contaminación. Someten las muestras a un pretratamiento de lavado con agua bidestilada y secado en estufa a 45 °C para la obtención final de una muestra homogénea. La extracción de los HAP del musgo se realiza con una mezcla de HEX-

ACE (90:10) en el horno microondas (80°C, 16 min). Los extractos filtrados se concentran en un evaporador Syncore®. La etapa de limpieza se realiza por SPE con florisil® y posterior elución de los HAP con HEX y una mezcla de DCM-HEX (20:80) empleando para ello el sistema automático de vacío Visiprep®. El eluato se concentra, nuevamente en Syncore, antes de su inyección GC-MS-MS utilizando un inyector con temperatura programada PTV (*Programme Temperature Detector*). El método es exacto con un rango de recuperación analítica entre el 83-108% y es preciso con una incertidumbre < 20%. Además, el estudio también demostró su idoneidad para el análisis de otras especies de musgo como el *Sphagnum sp.* y el *Hypnum cupressiforme*.

El desarrollo de novedosas técnicas de extracción en el campo de la química analítica, vieron su aplicación en Liu *et al.* 2005 que estudiaron la diferente distribución de los HAP a diferentes altitudes en la montaña de Nanling al sur de China. La especie *Hypnum plumaeformae*, previo secado, fue sometida a un proceso de extracción con disolvente a presión en equipo ASE200® con DCM: ACE (1:1) como disolvente en las siguientes condiciones (1500 psi, 100 °C, dos ciclos, cada uno de los cuales duró 5 minutos de calentamiento y 5 minutos de tiempo de extracción estática). Tras la evaporación con un rotavapor a 30°C, se realizó una limpieza mediante una SPE, con una columna de óxido de aluminio, sílice y florisil, eluyendo los HAP con DCM. Se redujo el volumen con un evaporador y se determinó mediante un análisis de GC-MS. Las concentraciones totales de HAP variaron de 310 a 1210 ng/g, con una media de 640 ng/g, siendo el fenantreno el más abundante. Las concentraciones de la mayoría de los HAP en los musgos disminuyeron en general con el aumento de la altitud, donde había mayor proporción en los HAP ligeros (2-3 anillos), menor concentración en los HAP pesados (5-6 anillos) y un contenido relativamente estable de HAP de 4 anillos. Con esto, concluyó que el denso flujo de aire frío fue el principal mecanismo para la distribución de la composición de los HAP a lo largo del perfil altitudinal. Años más tarde Galuszka (2007) emplearon la misma técnica de extracción acelerada con disolventes (ASE) para estudiar la distribución de los HAP y elementos traza en musgos de diferentes comunidades forestales del sur de Polonia y encontrar posibles relaciones químicas y ambientales. Se analizaron 16 HAP y elementos traza en muestras de *Hylocomium splendens* y *Pleurozium schreberi*. Emplearon el mismo extractor ASE200® y el mismo disolvente DCM. La concentración de los extractos se realizó mediante una corriente de nitrógeno en el sistema automatizado Turbo Vap II®. El método presenta una buena exactitud con valores de recuperación analítica entre el 74-96%. Los rangos de concentración de HAP, obtenidos mediante la determinación por GC-MS, oscilan entre 92-1040 ng/g, para los HAP más volátiles (4 anillos), de 21-272 ng/g (3- 5 anillos) y de 5-131 ng/g (> 6 anillos). Observó que las concentraciones de HAP difieren de un sitio a otro y hay mayor variabilidad en el Phe, Ft, Pyr y BaA concluyendo que estas diferencias en las concentraciones de HAP pueden explicarse según el tipo de bosque donde se realice el

muestreo, como por ejemplo que haya ausencia de sotobosque o presencia de un dosel denso. **Foan et al. (2012)** realizaron un estudio para optimizar el método de extracción de los HAP en musgos mediante la técnica extracción líquida presurizada (PLE) seguida de la limpieza del extracto en fase sólida (SPE), en asociación con el análisis por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la detección por fluorescencia (HPLC-FL). Para el desarrollo del método, se prepararon muestras homogéneas a partir de grandes cantidades de musgos de las especies *Isothecium myosuroides* Brid. e *Hypnum cupressiforme* Hedw., recogidos en una reserva natural en España. Realizan un diseño factorial para la selección de las condiciones óptimas de extracción, que finalmente son: 2 ciclos estáticos de 5 minutos en 80 °C. Para la fase de limpieza utilizaron florisil® por demostrar ser la fase más selectiva y la que aseguraba una mejor exactitud obteniendo finalmente recuperaciones analíticas del 70% con un rango de concentraciones de HAP entre 130-233 ng/g. La técnica es comparable con la extracción Soxhlet, pero con la ventaja de reducir el consumo de disolventes y acortar hasta cinco veces el tiempo de extracción. También utilizaron esta técnica **Stawson et al. (2020)** para medir la concentración de HAP en especímenes de herbario de briofitas de Groenlandia recogidas en diferentes momentos, entre 1920-1970, para investigar las tendencias históricas de la contaminación atmosférica en el país. La extracción se realizó con un ASE-200® con una mezcla de pentano: DCM (90:10) en las siguientes condiciones: 1500 psi, tiempo de precalentamiento de 2 min y tiempo estático de 5 min, volumen de lavado del 70%, tiempo de purga de 60 s, 2 ciclos estáticos, 100°C. Después de concentrar a 40°C, los extractos se evaporaron a menos de 5 ml para ser inyectados posteriormente en GC-MS. La mayor concentración se observó para el Phe en la década de 1920, con 1253 ng/g, seguido de Naf con una concentración de 897 ng/g en la década de 1940, el Ft con 192 ng/g en la década de 1920 y el Pyr con 115 ng/g en la década de 1940. La presencia de concentraciones más elevadas de HAP de bajo peso molecular es una prueba de que la contaminación por HAP en Groenlandia se debe al transporte a larga distancia y no a fuentes locales. Los resultados muestran picos de deposición atmosférica de HAP en la primera parte del siglo XIX, seguidos de una tendencia a la disminución en los siglos posteriores, debido a que las fuentes de combustión más usadas en aquella época, como el carbón y la madera, fueron disminuyendo su actividad industrial y doméstica, tal como indicó Foan et al.2010. Los resultados ponen de manifiesto el valor de las briofitas como bioindicadores para medir la contaminación atmosférica por HAP.

En los últimos años cobra importancia una novedosa técnica de extracción: la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD, *Matrix Solid-Phase Dispersion*) por sus innegables mejoras en cuanto a la posibilidad de hacer la extracción y limpieza en una única etapa, con la consiguiente reducción del tiempo dedicado a la preparación de muestra y consumo de disolventes. Así, **Concha-Graña et al. (2015b)** y **Aboal et al. (2020)** analizaron muestras desvitalizadas de clones de musgo de *Sphagnum*

palustre L., aplicando MSPD seguida de una determinación por PTV-GC-MS/MS. Con ello se pretendía evaluar la utilidad de la, ya comentada, *Mossphere*[®] (clon de musgo) en la vigilancia de los niveles de HAP en el aire a la vez que se validaba la aplicación de la MSPD a este tipo de muestras. **Concha-Graña et al. (2015b)**. El muestreo con las *Mossphere*[®] duró 6 semanas en cinco localizaciones diferentes: urbano (cerca del tráfico y del mar); suburbano (a 5km de la ciudad y a 500m del mar); industrial (1 km de una zona industrial); agrícola y, por último, un emplazamiento de fondo en una zona remota. El pretratamiento consistió en un secado en estufa (24 h a 40 °C) y molienda. La extracción de la muestra se realiza con C₁₈ (3 min) hasta que la dispersión sea homogénea. La mezcla se coloca en una columna de SPE que contiene florisil[®] y sulfato de sodio anhidro. Las condiciones de elución y determinación cromatográfica son las indicadas en Concha-Graña et al. (2015a). Los parámetros analíticos del método son satisfactorios: veracidad (84-116%), precisión (precisión intermedia < 11%) y buena sensibilidad (límites de cuantificación < 1,7 ng/g). En el mismo estudio se aplicó el procedimiento experimental optimizado de MSPD a otras muestras diferentes para ver su aplicabilidad y robustez: musgos naturales de *Sphagnum sp.* y de *H. cupressiforme* (obteniéndose recuperaciones entre 43-90% y de 41-103%, respectivamente, según el HAP) así como a líquenes de la especie *P. furfurácea* con recuperaciones entre 41-102%.

Aboal et al. (2020) utilizaron esta técnica innovadora para estudiar la variabilidad de los niveles atmosféricos de HAP recogidos en la *Mossphere*[®] en comparación con los métodos convencionales, y probar la eficacia de este dispositivo. El pretratamiento de la muestra, la extracción y determinación son los indicados por Concha-Graña et al. (2015b). La concentración total en la deposición atmosférica total (método convencional) es de 0,05-6,86 µg/m²·día, y los detectados con la *Mossphere*[®] de 0,0086- 3,194 µg/m²·día. Por otro lado, la concentración de HAP en el particulado atmosférico PM₁₀ (método convencional) fue de 0,346-6,985 µg/m³, y en la *Mossphere*[®] 1,506-46,768 µg/m³. Con estos resultados, se pudo explicar alrededor del 50% de la variabilidad de las concentraciones de HAP de 4, 5 y 6 anillos y de los HAP totales detectados en el particulado atmosférico PM₁₀, y aproximadamente el 70% de las concentraciones correspondientes detectadas en el método oficial de deposición (colectores de embudo). El uso del clon de *Sphagnum* permite la estandarización de la monitorización, lo que hace que el dispositivo de *Mossphere*[®] sea una buena herramienta de muestreo para controlar los HAP de 4, 5 y 6 anillos y el total de HAP, especialmente los asociados a la deposición masiva.

5. CONCLUSIONES/CONCLUSIÓNS/CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

Para evaluar la calidad del aire, además de los métodos de referencia establecidos en la normativa vigente, existen diferentes aproximaciones como, por ejemplo, el uso de musgos ya que los nutrientes que necesitan para su crecimiento provienen de la deposición atmosférica. Es una herramienta barata y fiable que proporciona información muy detallada de los contaminantes presentes en el aire. Del estudio realizado se puede concluir lo siguiente:

1. Se diferencian claramente dos tipos de biomonitorización con musgos: pasiva y activa, siendo esta última, que conlleva la utilización de bolsas de musgo trasplantado, la más recomendada ya que resuelve la posible ausencia o escasez de musgo en la zona objeto de evaluación y además reduce el alto grado de variabilidad que existe, en la absorción de contaminantes por el musgo nativo en función de su especie y de su estado de crecimiento. Los principales aspectos clave a tener en cuenta en este tipo de monitorización son:

- Selección del musgo: Aunque son muchas las especies que se utilizan en la bibliografía consultada (*Sphagnum*, *Hypnum cupressiforme* Hedw., *Pseudoscleropodium purum* (Hedw.) Fleischer, *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. y *Hylocomium splendens* (Hedw) y todos son válidos para ser usados como biomonitores, se recomienda utilizar el musgo de género *Sphagnum* debido a su morfología, propiedades físico-químicas y que puede ser clonado.
- Preparación del musgo: La parte de musgo que se recomienda para la técnica *moss bag* son los brotes verdes, que garantizan una homogeneidad en composición inicial, ya que los tejidos con más edad contendrán diferente cantidad de elementos en función de su grado de exposición.
- Pre-exposición: Si se utiliza musgo vivo, se recomienda lavarlo con agua y un secado a baja temperatura (que va desde la temperatura ambiente hasta los 40 °C), para que el musgo no muera. Sin embargo, si se utiliza musgo muerto, el material debe ser tratado primero con disoluciones (EDTA) para liberar los sitios de intercambio catiónico, para desvitalizar el musgo, mientras se minimiza la fragmentación de los tejidos.
- Preparación del trasplante: Las bolsas de musgo han de ser de nylon ya que este material es inerte y no interfiere en el proceso de adsorción, con un tamaño de malla de 2 mm, para la pérdida mínima del musgo, de forma esférica porque captura una mayor concentración de contaminantes, y con una relación entre el peso del musgo y la superficie de la bolsa de 5,86 mg/cm².
- Exposición: se recomienda una altura de 4 metros, lejos de cualquier obstáculo que pueda interferir en la acumulación de contaminantes y un tiempo de exposición de 8 semanas.
- Post-exposición: No se recomienda ningún tratamiento.

Sin embargo, la biomonitorización activa no está exenta de inconvenientes, como la disponibilidad del musgo y lo que es más importante el no disponer de métodos o protocolos estandarizados para su utilización. Con esto, ante la búsqueda de una técnica normalizada, se desarrollan nuevas estrategias, el diseño de una bioherramienta (Mossphere[®]) en el marco del proyecto europeo “MOSSclone. Se emplea un clon de musgo desvitalizado de la especie *Sphagnum palustre* que se cultiva y produce en biorreactores; así se reduce el impacto medioambiental por la recogida de musgo y se obtiene un material homogéneo.

2. Para la selección de las técnicas de extracción de HAP en los musgos se tienen en cuenta una serie de factores como son la eficiencia de extracción, cantidad de muestra, tipo de matriz, naturaleza del analito, tiempo de extracción, naturaleza del disolvente de acuerdo con la química verde, inversión económica, etc. Los procedimientos empleados deben ser reproducibles, independiente de la naturaleza de la matriz y proporcionar resultados exactos.

Tras la revisión bibliográfica, se observó que las técnicas más utilizadas son las técnicas tradicionales como Soxhlet o ultrasonidos, aunque las técnicas más avanzadas (MAE, PLE o MSPD) ganan fuerza, ya que minimizan el consumo de disolvente, cantidad de residuos, tiempo de extracción y manipulación de la muestra. Soxhlet presenta un tiempo de extracción mucho mayor que el resto de las técnicas, entre 6-48h, a diferencia de los minutos que conllevan las técnicas más avanzadas, esto unido al alto consumo de disolvente (100-400 mL) no lo hace una técnica verde. La extracción asistida por ultrasonidos también emplea volúmenes grandes de disolventes (50-200 mL) y para alcanzar eficiencias de extracción óptimas, se recurre a extracciones sucesivas de las muestras con disolvente nuevo. Por el contrario, la extracción asistida con energía de microondas, MAE, es un método rápido, ya que se acortan los tiempos (4-30 minutos) y se puede realizar la extracción simultánea de varias muestras con el empleo de volúmenes de disolventes menores (10-30 mL), sin embargo, requiere una etapa de filtración y el equipo tiene un coste elevado. Con el empleo de disolventes a presión, PLE/ASE, el tiempo de extracción es similar, teniendo en cuenta que es una extracción en serie, ahorrando bastante tiempo, sin embargo, el equipo es más costoso y realiza extracciones poco selectivas lo que requieren etapas de limpieza del extracto más severas o drásticas. Por último, la técnica de dispersión de la matriz, MSPD, permite realizar las etapas de extracción y limpieza en un solo paso, sin necesidad de purificación adicional de los extractos, lo que la convierte en una técnica rápida, con un menor consumo de disolventes (10-30 mL), de bajo coste y cumple todos los criterios de la química verde. La determinación de estos analitos a nivel traza en este tipo de muestra complejas, requiere del uso de técnicas de separación cromatográficas acopladas a detectores selectivos y sensibles. Así, en la bibliografía consultada un 77% emplea la GC-MS y un 22% la HPLC-MS. El espectrómetro

de masas es el mejor detector que se puede acoplar a cualquiera de ambas técnicas ya que aporta las ventajas de sensibilidad (gracias a la acción del analizador que actúa como filtro de masas, reduciendo la interferencia de fondo) y de especificidad para la identificación de analitos desconocidas. Por otro lado, la inyección de grandes volúmenes con el inyector de temperatura programa (PTV) ofrece los mejores límites de detección y cuantificación.

CONCLUSIONES

Para avaliar a calidade do aire, ademais dos métodos de referencia establecidos na normativa vixente, existen diferentes aproximacións como, por exemplo, o uso de musgos xa que os nutrientes que necesitan para o seu crecemento proveñen da deposición atmosférica. É unha ferramenta barata e fiable que proporciona información moi detallada dos contaminantes presentes no aire. Do estudo realizado pódese concluir o seguinte:

1. Diferéncianse claramente dous tipos de biomonitorización con musgos: pasiva e activa, sendo esta última, que conleva a utilización de bolsas de musgo trasplantado, a máis recomendada xa que resolve a posible ausencia ou escaseza de musgo na zona obxecto de avaliación e ademais reduce o alto grao de variabilidade que existe, na absorción de contaminantes polo musgo nativo en función da súa especie e do seu estado de crecemento. Os principais aspectos clave a ter en conta neste tipo de monitoraxe son:
 - Selección do musgo: Aínda que son moitas as especies que se utilizan na bibliografía consultada (*Sphagnum*, *Hypnum cupressiforme* Hedw., *Pseudoscleropodium purum* (Hedw.) Fleischer, *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. e *Hylocomium splendens* (Hedw) e todos son válidos para ser usados como biomonitores, recoméndase utilizar o musgo de xénero *Sphagnum* debido á súa morfoloxía, propiedades físico-químicas e que pode ser clonado.
 - Preparación do musgo: A parte de musgo que se recomenda para a técnica moss bag son os brotes verdes, que garanten unha homoxeneidade en composición inicial, xa que os tecidos con máis idade conterán diferente cantidade de elementos en función do seu grao de exposición.
 - Pre-exposición: Se se utiliza musgo vivo, recoméndase lavallo con auga e un secado a baixa temperatura (que vai desde a temperatura ambiente ata os 40 ° C), para que o musgo non morra. Con todo, se se utiliza musgo morto, o material debe ser tratado primeiro con disolucións (EDTA) para liberar os sitios de intercambio catiónico, para desvitalizar o musgo, mentres se minimiza a fragmentación dos tecidos.
 - Preparación do trasplante: As bolsas de musgo han de ser de nylon xa que este material é inerte e non interfere no proceso de absorción, cun tamaño de malla de 2 mm, para a perda mínima do musgo, de forma esférica porque captura unha maior concentración de contaminantes, e cunha relación entre o peso do musgo e a superficie da bolsa de 5,86 mg/cm².

- Exposición: recoméndase unha altura de 4 metros, lonxe de calquera obstáculo que poida interferir na acumulación de contaminantes e un tempo de exposición de 8 semanas
- Post-exposición: Non se recomenda ningún tratamento.

Sen embargo, a biomonitorización activa non está exenta de inconvenientes, como a dispoñibilidade do musgo e o que é máis importante o non dispoñer de métodos ou protocolos estandarizados para a súa utilización. Con isto, ante a procura dunha técnica normalizada, desenvólvense novas estratexias, o deseño dunha bioherramienta (Mossphere[®]) o marco do proxecto europeo “MOSSclone. Emprégase un clon de musgo desvitalizado da especie *Sphagnum palustre* que se cultiva e produce en biorreactores; así se reduce o impacto ambiental pola recollida de musgo e obtense un material homoxéneo.

2. Para a selección das técnicas de extracción de HAP nos musgos téñense en conta unha serie de factores como son a eficiencia de extracción, cantidade de mostra, tipo de matriz, natureza do analito, tempo de extracción, natureza do disolvente de acordo coa química verde, investimento económico, etc. Os procedementos empregados deben ser reproducibles, independente da natureza da matriz e proporcionar resultados exactos.

Tras a revisión bibliográfica, observouse que as técnicas máis utilizadas son as técnicas tradicionais como Soxhlet ou ultrasóns, aínda que as técnicas máis avanzadas (MAE, PLE ou MSPD) gañan forza, xa que minimizan o consumo de disolvente, cantidade de residuos, tempo de extracción e manipulación da mostra. Soxhlet presenta un tempo de extracción moito maior que o resto das técnicas, entre 6-48 h, a diferenza dos minutos que conlevan as técnicas máis avanzadas, isto unido ao alto consumo de disolvente (100-400 mL) non o fai unha técnica verde. A extracción asistida por ultrasóns tamén emprega volumes grandes de disolventes (50-200 mL) e para alcanzar eficiencias de extracción óptimas, recórrese a extraccións sucesivas das mostras con disolvente novo. Pola contra, a extracción asistida con enerxía de microondas, MAE, é un método rápido, xa que se acurtan os tempos (4-30 minutos) e pódese realizar a extracción simultánea de varias mostras co emprego de volumes de disolventes menores (10-30 mL), con todo, require unha etapa de filtración e o equipo ten un custo elevado. Co emprego de disolventes a presión, PLE/ASE, o tempo de extracción é similar, tendo en cuenta que é unha extracción en serie, aforrando bastante tempo, con todo, o equipo é máis custoso e realiza extraccións pouco selectivas o que requiren etapas de limpeza do extracto máis severas ou drásticas. Por último, a técnica de dispersión da matriz, MSPD, permite realizar as etapas de extracción e limpeza nun só paso, sen necesidade de purificación adicional dos extractos, o que a converte nunha técnica rápida, cun menor consumo de disolventes (10-30 mL), de baixo coste e cumpre todos os criterios da química verde.

A determinación destes analitos a nivel traza neste tipo de mostra complexas, require do uso de técnicas de separación cromatográficas axustadas a detectores selectivos e sensibles. Así, na bibliografía consultada un 77% emprega a GC- MS e un 22% a HPLC- MS. O espectrómetro de masas é o mellor detector que se pode axustar a calquera de ambas as técnicas xa que achega as vantaxes de sensibilidade (grazas á acción do analizador que actúa como filtro de masas, reducindo a interferencia de fondo) e de especificidade para a identificación de analitos descoñecidas. Doutra banda, a inxección de grandes volumes co inyector de temperatura programa (PTV) ofrece os mellores límites de detección e cuantificación.

CONCLUSIONS

To assess air quality, in addition to the reference methods established in the current regulations, there are different approaches such as, for example, the use of mosses, since the nutrients they need for their growth come from atmospheric deposition. It is an inexpensive and reliable tool that provides very detailed information on the pollutants present in the air. The following conclusions can be drawn from the study:

1. Two types of biomonitoring with mosses are clearly differentiated: passive and active, the latter, which involves the use of transplanted moss bags, being the most recommended as it solves the possible absence or scarcity of moss in the area under evaluation and also reduces the high degree of variability that exists, in the absorption of pollutants by native mosses depending on their species and growth stage. The main key aspects to consider in this type of monitoring are:
 - Selection of moss: Although many species are used in the literature (*Sphagnum*, *Hypnum cupressiforme* Hedw, *Pseudoscleropodium purum* (Hedw.) Fleischer, *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. and *Hylocomium splendens* (Hedw) and all are valid to be used as biomonitors, it is recommended to use the moss of the genus *Sphagnum* due to its morphology, physico-chemical properties and that it can be cloned.
 - Preparation of the moss: The part of the moss that is recommended for the moss bag technique is the green shoots, which guarantee homogeneity in initial composition, as older tissues will contain different amounts of elements depending on their degree of exposure.
 - Pre-exposure: If live moss is used, washing with water and drying at low temperature (ranging from room temperature to 40 °C) is recommended, so that the moss does not die. However, if dead moss is used, the material should first be treated with solutions (EDTA) to release the cation exchange sites, to devitalize the moss, while minimising tissue fragmentation.
 - Transplant preparation: Moss bags should be nylon as this material is inert and does not interfere with the adsorption process, with a mesh size of 2 mm for minimal moss loss, spherical in shape

because it captures a higher concentration of contaminants, and with a ratio of moss weight to bag surface area of 5,86 mg/cm².

- Exposure: A height of 4 metres is recommended, away from any obstacles that may interfere with the accumulation of contaminants and an exposure time of 8 weeks.
- Post-exposure: No treatment is recommended.

However, active biomonitoring is not without drawbacks, such as the availability of moss and more importantly the lack of standardised methods or protocols for its use. With this in mind, in the search for a standardised technique, new strategies are being developed, the design of a bio-tool (Mossphere®) in the framework of the European project "MOSSclone. A devitalised moss clone of the *Sphagnum palustre* species is used, which is cultivated and produced in bioreactors, thus reducing the environmental impact of moss collection and obtaining a homogeneous material.

2. The selection of PAH extraction techniques for mosses takes into account a number of factors such as extraction efficiency, sample quantity, type of matrix, nature of the analyte, extraction time, nature of the solvent in accordance with green chemistry, economic investment, etc. The procedures used must be reproducible, independent of the nature of the matrix and provide accurate results.

After the literature review, it was observed that the most commonly used techniques are traditional techniques such as Soxhlet or ultrasound, although more advanced techniques (MAE, PLE or MSPD) are gaining strength, as they minimise solvent consumption, amount of waste, extraction time and sample handling. Soxhlet has a much longer extraction time than the rest of the techniques, between 6-48h, as opposed to the minutes required by the more advanced techniques. This, together with the high solvent consumption (100-400 mL), does not make it a green technique. Ultrasound-assisted extraction also uses large volumes of solvent (50-200 mL) and to achieve optimal extraction efficiencies, successive extractions of the samples with fresh solvent are used. In contrast, microwave-assisted extraction, MAE, is a fast method, as times are shortened (4-30 minutes) and simultaneous extraction of several samples can be performed using smaller solvent volumes (10-30 mL), however, it requires a filtration step and the equipment is expensive. With the use of pressurised solvents, PLE/ASE, the extraction time is similar, taking into account that it is a serial extraction, saving considerable time; however, the equipment is more expensive and performs extractions that are not very selective, requiring more severe or drastic extract clean-up stages. Finally, the matrix dispersion technique, MSPD, allows the extraction and clean-up steps to be performed in a single step, without the need for additional purification of the extracts, making it a fast, low-solvent (10-30 mL) and low-cost technique that meets all the criteria of green chemistry.

The determination of these analytes at trace level in this type of complex sample requires the use of chromatographic separation techniques coupled to selective and sensitive detectors. Thus, in the literature consulted, 77% use GC-MS and 22% HPLC-MS. The mass spectrometer is the best detector that can be coupled to either technique as it provides the advantages of sensitivity (thanks to the action of the analyser acting as a mass filter, reducing background interference) and specificity for the identification of unknown analytes. On the other hand, the injection of large volumes with the programmed temperature injector (PTV) offers the best limits of detection and quantification.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aboal, J.R.; Concha-Graña, E.; De Nicola, F.; Muniategui-Lorenzo, S.; López-Mahía, P.; Giordano, S.; Capozzi, F.; Di Palma, A.; Reskif, R.; Zechmeister, H.; Martínez-Abaigar, J.; Fernández, J.A. (2020). Testing a novel biotechnological passive sampler for monitoring atmospheric PAH pollution. *Journal of Hazardous Materials* 381, 120949.
- AENOR. Bioseguimiento en musgos. Acumulación de contaminantes atmosféricos en musgos recolectados in situ: desde la recolección hasta la preparación de muestras. UNE- EN 16414, diciembre 2014.
- Ares, Á.; Fernández, J.A.; Ramón, J.; Aboal, J.R.; Carballeira, A. (2011). Study of the air quality in industrial areas of Santa Cruz de Tenerife (Spain) by active biomonitoring with *Pseudoscleropodium purum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74 (3), 533-541.
- Ares, A.; Aboal, J.R.; Carballeira, A.; Giordano, S.; Adamo, P.; Fernández, J.A. (2012). Moss bag biomonitoring: A methodological review. *Science of the Total Environment* 432, 143-158.
- Ares, A.; Aboal, J.R.; Fernández, J.A.; Real, C.; Carballeira, A. (2009) Use of the terrestrial moss *Pseudoscleropodium purum* to detect sources of small-scale contamination by PAHs. *Atmospheric Environment* 43, 5501–5509.
- Ares, A.; Fernandez, J.A.; Carballeira, A.; Aboal, J.R. (2014). Towards the methodological optimization of the moss bag technique in terms of contaminants concentrations and replicability values. *Atmospheric Environment* 94, 496-507.
- Ávila, A; Aguiillaume, L. (2017) Monitorización y tendencias de la deposición de N en España, incluyendo el polvo Sahariano. *Ecosistemas* 26 (1), 16-24.

- Barcellos Hoff, R.; Mara Pizzolato, T. (2018). Combining extraction and purification steps in sample preparation for environmental matrices: A review of matrix solid phase dispersion (MSPD) and pressurized liquid extraction (PLE) applications. *Trends in Analytical Chemistry* 109, 83-96.
- Barrado, A.I.; García, S.; Pérez, R. M. (2013). Desarrollo de una Metodología Analítica para la Determinación de Compuestos Aromáticos Policíclicos en las Fracciones PM_{2,5} -PM₁₀ del Aerosol Atmosférico. *Departamento de Medio Ambiente*. Ciudad Universitaria de Madrid.
- Beike, A.; Spagnuolo, V.; Lu, V.; Steinhart, F.; Ramos-Gómez, J.; Krebs, M.; Adamo, P.; Rey-Asensio, A.I.; Fernández, J.A.; Giordano, S.; Decker, E.; Reski, R. (2014). Clonal in vitro propagation of peat mosses (*Sphagnum* L.) as novel green resources for basic and applied research. *Plant Cell Tiss Organ. Cult.* **120**, 1037–1049.
- Boquete, M.T.; Fernández, J.A.; Aboal, J.R.; Carballeira, A. (2011). Analysis of temporal variability in the concentrations of some elements in the terrestrial moss *Pseudoscleropodium purum*. *Environmental and Experimental Botany* 72, 210-216.
- Calvo, D.; Molina, M^a T; Salvachúa, J. (2016). Ciencias de la Tierra y Medioambientales. Tema 10, 234-262. McGraw-Hill.
- Capozzi, F.; Adamo, P.; Di Palma, A.; Aboal, J.R.; Bargagli, R.; Fernandez, J.A.; López-Mahía, P.; Reski, R.; Tretiach, M.; Spagnuolo, V.; Giordano, S. (2017). *Sphagnum palustre* clone vs. *Pseudoscleropodium purum*: A first trial in the field to validate the future of the moss bag technique. *Environmental Pollution* 225, 323-328.
- Capozzi, F.; Di Palma, A.; Adamo, P; Spagnuolo, V.; Giordano, S. (2017). Monitoring chronic and acute PAH atmospheric pollution using transplants of the moss *Hypnum cupressiforme* and *Robinia pseudacacia* leaves. *Atmospheric Environment* 150, 45-54.
- Capozzi, F.; Giordano, S; Aboal, J.R.; Adamo, P.; Bargagli, R.; Boquete, T.; Di Palma, A.; Real, C.; Reski, R.; Spagnuolo, V.; Steinbauer, K.; Tretiach, M.; Varela, Z.; Zechmeister, H.; Fernandez, J.A. (2016). Best options for the exposure of traditional and innovative moss bags: A systematic evaluation in three European countries. *Environmental Pollution* 214, 362-373.
- Carro Díaz, A.M. (2011). Química Analítica: materiales docentes: *Grado de Ingeniería Química*. USC. <http://hdl.handle.net/10347/3525>
- Castello, M. (2007). A Comparison Between Two Moss Species Used as Transplants for Airborne Trace Element Biomonitoring in NE Italy. *Environmental Monitoring Assessment* 133, 267–276.

- Celeiro Montero, M. (2015). Nuevos procedimientos de preparación de muestra y análisis cromatográfico para la determinación de productos de cuidado personal y contaminantes de interés prioritario. *Tesis doctoral*. USC, <http://hdl.handle.net/10347/13568>.
- Colabuono, F.; Taniguchi, S.; Vinícius Zecchin Cipro, C.; da Silva, J.; Caruso Bícego, M.; Carmela Montone, R. (2015). Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in mosses after fire at the Brazilian Antarctic Station. *Marine Pollution Bulletin* 93, 266- 269.
- Concha-Graña, E.; Piñeiro-Iglesias, M.; Muniategui-Lorenzo, S.; López-Mahía, P.; Prada-Rodríguez, D. (2015a). Proposal of a procedure for the analysis of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in mosses. *Talanta* 134, 239-246.
- Concha-Graña, E.; de Nicola, F.; Muniategui-Lorenzo, S.; Aboal, J.; Rey-Asensio, A.I.; Giordano, S.; Reski, R.; López-Mahía, P.; Prada-Rodríguez, D. (2015b). Matrix solid phase dispersion method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in moss. *Journal of Chromatography A* 1406, 19-26.
- CORDIS (*Community Research and Development Information Service*). <https://cordis.europa.eu/article/id/151197-monitoring-air-pollution-with-moss/es>. Última fecha de consulta: 10/02/21.
- Culicov, O.A.; Yurukova, L. (2006). Comparison of element accumulation of different moss and lichen-bags, exposed in the city of Sofia (Bulgaria). *Atmospheric Chemistry* 55, 1-12.
- De Nicola, F.; Murena, F.; Costagliola, M.A.; Alfani, A.; Baldantoni, D.; Prati, V.; Sessa, L.; Spagnuolo, V.; Giordano, S. (2013). A multi-approach monitoring of particulate matter, metals and PAHs in an urban street canyon. *Environmental science and pollution research* 20, 4969–4979.
- Decisión n° 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de noviembre de 2001, por la que se aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE.
- Decker, E.L.; Reski, R. (2020). Mosses in biotechnology. *Plant Biotechnology* 61, 21-27.
- Directiva 2008/50/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de mayo de 2008, relativa a la calidad del aire ambiente y a una atmósfera más limpia en Europa.
- Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de agosto de 2013, por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas Texto pertinente a efectos delEEE

- Dolegowska, S.; Migaszewski, M. (2011). PAH concentrations in the moss species *Hylocomium splendens* (Hedw.) B.S.G. and *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. from the Kielce area (south-central Poland). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1636-1644.
- Esplugues, A.; Fernández-Patier, R.; Aguilera, I.; Iñíguez, C.; García Dos Santos, S.; Aguirre Alfaro, A.; Lacasaña, M.; Estarlich, M.; Grimalte, J.O.; Fernández, M.; Rebagliato, M.; Salah, M.; Tardóni, A.; Torrent, M.; Martínez, M^aD.; Ribas-Fitó, N.; / Sunyer, J.; Ballester, F. (2007). Exposición a contaminantes atmosféricos durante el embarazo y desarrollo prenatal y neonatal: protocolo de investigación en el proyecto INMA (Infancia y Medio Ambiente). *Gaceta Sanitaria* 21(2), 162-171.
- Fernández Amado, M. (2017). Microextracción en fase sólida "in-tube" para el análisis de compuestos orgánicos en matrices atmosféricas. *Tesis doctoral*. Facultad de Ciencias. UDC. <http://hdl.handle.net/2183/19452>
- Fernández, J.A.; Aboal, J.R.; Couto, J.A.; Carballeira, A. (2002). Sampling optimization at the sampling-site scale for monitoring atmospheric deposition using moss chemistry. *Atmospheric Environment* 36, 1163–1172.
- Fernández, J.A.; Rey, A.; Carballeira, A. (2000). An extended study of heavy metal deposition in Galicia (NW Spain) based on moss analysis. *The Science of the Total Environment* 54, 31-44.
- Florencia Tames, M. (2019). Evaluación de la contaminación del aire en ambientes internos de viviendas de zonas urbanas, periurbanas y rurales de la provincia de Córdoba. *Tesis doctoral*. Facultad de ciencias exactas físicas y naturales. Universidad nacional de Córdoba. <http://hdl.handle.net/11336/79646>
- Foan, L.; Simon, V. (2012). Optimization of pressurized liquid extraction using a multivariate chemometric approach and comparison of solid-phase extraction clean up steps for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in mosses. *Journal of Chromatography A* 1256, 22-31.
- Foan, L.; Sablayrolles, C.; Elustondo, D.; Lasheras, E.; González, L.; Ederra, A.; Simon, V.; Santamaría, J.M. (2010). Reconstructing historical trends of polycyclic aromatic hydrocarbon deposition in a remote area of Spain using herbarium moss material. *Atmospheric Environment* 44, 3207-3214.
- Folkesson, L. (1979). Interspecies calibration of heavy metal concentrations in nine mosses and lichens: Applicability to deposition measurements. *Water, Air, and Soil Pollution* 11, 253-260.

- Gailey, F.; Lloyd, O. (1986). Methodological Investigations into Low Technology Monitoring of Atmospheric Metal Pollution: Part 1 The Effects of Sampler Size on Metal Concentrations. *Environmental Pollution* 12, 41-59.
- Gałuszka, A. (2007). Distribution patterns of PAHs and trace elements in mosses *Hylocomium splendens* (Hedw.) B.S.G. and *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. from different forest communities: A case study, south-central Poland. *Chemosphere* 67, 1415–1422.
- Goodman, G.; Roberts, T.M. (1971). Plants and Soils as Indicators of Metals in the Air. *Nature* 231, 287-292.
- Holoubek, I.; Korinek, P.; Seda, Z.; Schneiderova, E.; Holoubkova, I.; Pacl, A.; Triska, J.; Cudlin, P.; Caslavsky, J. (2000) The use of mosses and pine needles to detect persistent organic pollutants at local and regional scales. *Environmental Pollution* 109, 283- 292.
- <http://www.mossclone.eu/> , última fecha de consulta (17/02/2021)
- Liu, X.; Zhang, G.; Jones, K.; Li, X.; Peng, X.; Qi, S. (2005). Compositional fractionation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mosses (*Hypnum plumaeformae* WILS.) from the northern slope of Nanling Mountains, South China. *Atmospheric Environment* 39, 5490–5499.
- Ozores Belmonte, M.I. Cromatografía de líquidos HPLC. Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid. <https://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/cromatografa-de-liquidos-hplc>. Última fecha de consulta: 13/02/21.
- Krommer, V.; Zechmeister, H.; Roder, I.; Scharf, S.; Hanus-Ilmar, A. (2007) Monitoring atmospheric pollutants in the biosphere reserve Wienerwald by a combined approach of biomonitoring methods and technical measurements. *Chemosphere* 67, 1956–1966.
- Luque de Castro, M.D.; Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A* 1217, 2383–2389.
- Martí Ezpeleta, A. (2000). Clima y calidad ambiental. *VI reunión nacional de climatología*. Asociación de geógrafos españoles. Cursos y congresos de la Universidad de Santiago. <http://hdl.handle.net/10347/8882>
- Mastandrea, C.; Chichizola, C.; Ludueña, B.; Sánchez, H.; Álvarez, H.; Gutiérrez, A. (2005). Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39 (1), 27-36.

- Menéndez García, M. L. (2013). Determinación de ftalatos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem (GC/MSMS). *Máster biotecnología avanzada*. UDC. <http://hdl.handle.net/2183/13685>
- Mukhopadhyay, S.; Dutta, R.; Das, P. (2020). A critical review on plant biomonitors for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in air through solvent extraction techniques. *Chemosphere* 251, 126441.
- Otvos, E.; Kozak, I.O.; Fekete, J.; Sharma, V.K.; Tuba, Z. (2004). Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mosses (*Hypnum cupressiforme*) in Hungary. *Science of the Total Environment* 330, 89–99.
- Palacios Ansón, M.P. (2018). La etapa de preparación de la muestra en los métodos analíticos. *Trabajo de fin de grado*. Universidad de Sevilla. <https://hdl.handle.net/11441/82200>
- Pena Sendón, M.T (2010). Desarrollo de nuevas metodologías de preparación de muestra para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en matrices medioambientales y alimentarias. *Tesis doctoral*. Facultad de Química. USC. <http://hdl.handle.net/10347/2824>
- Pérez Hernández, V.A. (2018). Musgos y líquenes como bioindicadores de contaminación atmosférica. *Trabajo de fin de grado*. Universidad Complutense. <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/VICTOR%20ALEJANDRO%20PEREZ%20HERNANDEZ.pdf>
- Real Decreto 102/2011, de 28 de enero, relativo a la mejora de la calidad del aire. BOE-A-2011-1645.
- Reglamento (UE) nº 835/2011 de la Comisión, de 19 de agosto de 2011, que modifica el Reglamento (CE) nº 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los productos alimenticios.
- Recursos de Química. <https://www.dequimica.info/rotavapor>. Última fecha de consulta: 13/02/21.
- Richter, C.; Dainty, J. (1989). Ion behavior in plant cell walls. I. Characterization of the *Sphagnum russowii* cell wall ion exchanger. *Canadian Journal of Botany* 67 (2), 451-459.
- Soriano Sanz, J.A. (2009). Evaluación y seguimiento del contenido en hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en mejillón silvestre de la costa de Galicia y Cantábrico, antes y después del vertido del B/T Prestige. *Tesis doctoral*. Facultad de Ciencias. UDC. <http://hdl.handle.net/2183/5670>

- Sun, S.; Wang, D.; He, M.; Zhang, C. (2008). Monitoring of atmospheric heavy metal deposition in Chongqing, China—based on moss bag technique. *Environmental Monitoring and Assessment* 148, 1-9.
- Swatson, K.; Mihaly, E.; Lange, C.; Ersnt, M.; Dela Cruz, M.; Price, M.J.; Mikkelsen, T.; Christensen, J.; Lundholm, N.; Ronsted, N. (2020). Biomonitoring of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Deposition in Greenland Using Historical Moss Herbarium Specimens Shows a Decrease in Pollution During the 20th Century. *Airborne Pollution in Greenlandic Mosses* 11.
- Szulejko, J.E.; Kim, K.H.; Brown, R.; Suk Bae, M. (2014). Review of progress in solvent-extraction techniques for the determination of polyaromatic hydrocarbons as airborne pollutants. *Trends in Analytical Chemistry* 61 ,40-48.
- Temple, P.J.; McLaughlin, D.L.; Linzon, S.N.; Wills, R. (1980). Moss Bags as Monitors of Atmospheric Deposition. *Journal of the Air Pollution Control Association*, 31(6), 668-670.
- Varela, Z.; Fernández, J.A.; Aboal, J.R.; Real, C.; Carballeira, A. (2010). Determination of the optimal size of area to be sampled by use of the moss biomonitoring technique. *Journal of Atmospheric Chemistry* 65 (1), 37-48.
- Wegener, J. W. M.; van Schaik, M. J. M.; Aiking, H. (1992). Active biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons by means of mosses. *Environmental Pollution* 76 ,15-18.
- Wianowska, D.; Gil, M. (2019). New insights into the application of MSPD in various fields of analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry* 112, 29-51.
- Zechmeister, H.; Dullinger, S.; Hohenwallner, D.; Riss, A.; Hanus-Illnar, A.; Scharf, S. (2006). Pilot Study on Road Traffic Emissions (PAHs, Heavy Metals) Measured by Using Mosses in a Tunnel Experiment in Vienna, Austria. *Environmental Pollution* 138, 238-249.

ANEXO I. CRONOGRAMA

	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero
Búsqueda Bibliográfica					
Realización de la memoria					