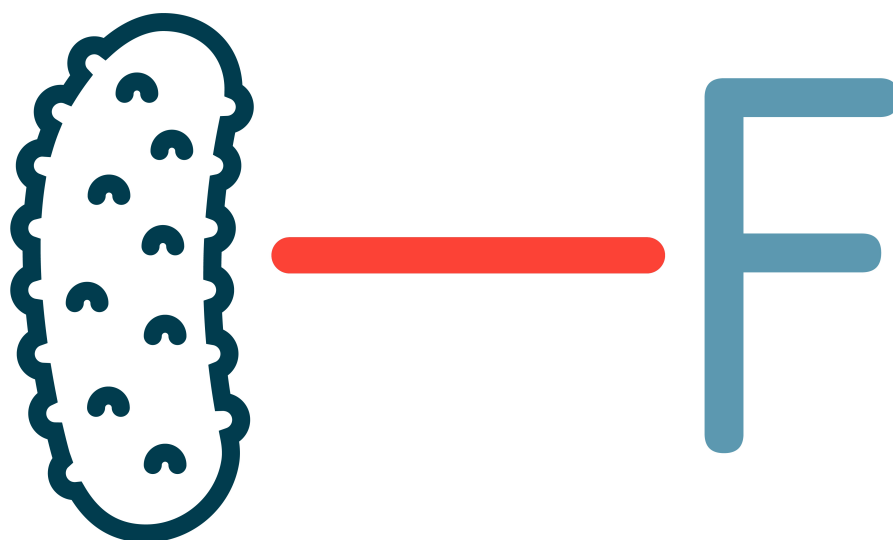


COMPUESTOS PERFLUORADOS EN EQUINODERMOS MARINOS: METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA SU DETERMINACIÓN Y MONITORIZACIÓN



Elena Mancilla Montero | Universidad de Sevilla





Trabajo de Fin de Grado

Universidad de Sevilla | Facultad de Farmacia

Grado	Grado en Farmacia
Título	Compuestos perfluorados en equinodermos marinos: metodología analítica para su determinación y monitorización.
Nombre	Elena Mancilla Montero
Fecha	Sevilla, Diciembre de 2017
Departamento	Química Analítica
Nombre del tutor	Julia Martín Bueno
Tipología del Proyecto	Experimental

ÍNDICE

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	04
RESUMEN	05
ABSTRACT	06
1. ANTECEDENTES	07
2. COMPUESTOS PERFLUORADOS (PFCs)	10
2.1 Estructura y usos de los PFCs	10
2.2 Distribución y efectos de la emisión de PFCs al medioambiente	11
2.3 Técnicas analíticas	13
2.3.1 Determinación instrumental	13
2.3.2 Técnicas de extracción en matrices acuosas	14
2.3.3 Técnicas de extracción en matrices sólidas	14
2.4 Regulación	16
2.4.1 Ámbito Salud Pública	16
2.4.2 Ámbito Medio ambiental	16
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1 Organismos de ensayo: Holoturia tubulosa	19
4.2 Toma de muestra	20
5. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO	21
5.1 Instrumentación	21
5.2 Reactivos	22
5.3 Procedimiento	23
5.4 Expresión de resultados	24
5.5 Validación del método	25
6. MONITORIZACIÓN DE PFCs EN HOLOTHURIA TUBULUSA	26
7. CONCLUSIONES	31
8. REFERENCIAS	32

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ESI:	Electrospray ionization
EWG:	Environmental working group
GC:	Gas chromatography
HPLC-MS/MS:	High performance liquid chromatography tandem-mass spectrometry
LC-MS:	Liquid chromatography-mass spectrometry
LC-MS/MS:	Liquid chromatography tandem mass spectrometry
LLE:	Liquid-liquid extraction
LLME:	Liquid-liquid microextraction
MRM:	Multiple reaction monitoring
NCA:	Normas de Calidad Ambiental
PFBuA:	Perfluorobutanoic acid
PFCs:	Perfluoroalkyl compounds
PFHpA:	Perfluoroheptanoic acid
PFHxA:	Perfluorohexanoic acid
PFOA:	Perfluorooctanoic acid
PFOS:	Perfluorooctanesulfonic acid
PFPeA:	Perfluoropentanoic acid
PLE:	Pressurized liquid extracción
POPs:	Persistent organic pollutants
PTFE:	Polytetrafluoroethylene
QqQ-MS:	Triple quadrupole mass spectrometer
SBSE:	Stir bar sorptive extraction
SPE:	Solid phase extraction
SPME:	Solid phase microextraction
USE:	Ultrasonic solvent extraction

RESUMEN

En los últimos años los disruptores endocrinos están en el punto de mira de estudios ambientales y ecotoxicológicos. Entre ellos destacan los compuestos perfluorados, tanto por su amplio uso industrial y doméstico como por su elevada actividad estrogénica demostrando efectos adversos a niveles traza. Se descargan al medio ambiente a través de efluentes industriales y de estaciones depuradoras de aguas residuales afectando principalmente a organismos marinos donde pueden acumularse si se produce una exposición a largo plazo.

Este hecho, unido a su elevada actividad estrogénica, muestra la necesidad de estudios en organismos acuáticos para conocer su comportamiento y sus efectos, a fin de preservar la biodiversidad y proteger la salud pública. Para contribuir a este fin, en este trabajo se propone un método analítico para la determinación de seis compuestos perfluorados en organismos marinos (*Holothuria tubulosa*) y se lleva a cabo un programa de monitorización ambiental para el seguimiento de estos compuestos en organismos procedentes de la costa granadina.

La metodología analítica implica un pretratamiento consistente en la liofilización, trituración y tamización de las vísceras y tratamiento mediante extracción con disolventes, limpieza del extracto por extracción en fase sólida dispersiva y posterior determinación mediante cromatografía de líquidos con detección de espectrometría de masas de triple cuadrupolo. Las recuperaciones obtenidas se situaron en el rango de 84 a 101 % con desviaciones estándar relativas inferior a 9 % y límites de cuantificación inferior a 0,03 ng/g (peso seco (ps)).

Todas las muestras dieron positivas en el análisis de los contaminantes. Los resultados obtenidos muestran concentraciones entre 667 ng/g (ps) para el ácido perfluorooctanoico (PFOA) y 0,81 ng/g (ps) para el ácido perfluoropentanoico (PFPeA). De manera general, los compuestos perfluorados de mayor cadena fluorocarbonada fueron cuantificados a concentraciones más elevadas que los de cadena corta.

Palabras claves: Disruptores endocrinos; Compuestos perfluorados; *Holothuria tubulosa*; Metodología analítica; Monitorización

ABSTRACT

In recent years endocrine disruptors have come into the spotlight of environmental and ecotoxicological studies. Among them, perfluorinated compounds stand out, both, for their wide industrial and domestic use and for their elevated estrogenic activity, showing adverse effects at trace level. They are released into the environment through industrial waste and wastewater discharges affecting to marine organisms, where they can accumulate if a long-term exposure occurs.

This fact, together with their elevated estrogenic activity, demonstrates the need of studies concerning the behaviour and effect on aquatic organisms in order to preserve the biodiversity and protect the public health. To contribute to this goal, this work proposes an analytical method for the simultaneous determination of six perfluorinated compounds in marine organisms (*Holothuria tubulosa*) and an environmental monitoring program is carried out in organisms from the Granada coast.

The sample treatment involve steps of lyophilization, solvent extraction and clean-up of the extracts with dispersive sorbents prior to liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis. Successful recoveries between 84 and 101 %, precision (RSD < 9 %) and limits of quantification below 0.03 ng/g dry weight (d.w.) were achieved.

All tested samples were positive in the analysis of contaminants. The obtained results show concentrations between 667 ng/g (dw) for perflorooctanoic acid (PFOA) to 0,81 ng/g (dw) for perfloropentanoic acid (PFPeA). In general, perfluorinated compounds of larger fluorocarbonated chain were quantified at higher concentration levels than those of shorter one.

Keywords: Endocrine disruptors; perfluorinated compounds; *Holothuria tubulosa*; Analytical methodology; Monitoring program.

1. ANTECEDENTES

Cuanta más capacidad tenemos de analizar el mundo que nos rodea, apreciamos mucho mejor nuestra huella en él. El desarrollo y avance de nuestra sociedad ha traído consigo nuevos problemas de contaminación ambiental. Existen muchas sustancias que están cambiando el mundo que nos rodea, contaminante previamente desconocido o no reconocido como tal, cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva, pero sí la preocupación por las posibles consecuencias de la misma.

Los disruptores endocrinos (EDCs, Endocrine Disruptor Compounds), también llamados alteradores endocrinos, son aquellos compuestos naturales y sintéticos capaces de afectar al sistema endocrino de los seres vivos a bajas concentraciones, modificando la actividad hormonal y causando graves daños en los individuos (Benigni y cols., 2017). Dentro de este grupo de compuestos se engloban un gran número de sustancias (más de 700 actualmente) utilizadas en el ámbito industrial y doméstico como productos de higiene personal, aditivos de plásticos, detergentes, pesticidas, etc.

Son residuos difíciles de tratar, muy persistentes y que tienen consecuencias imprevistas. Nos referimos, a compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medio ambiente no se considera significativa en términos de distribución y/o concentración, por lo que pasan inadvertidos; no obstante, ahora están siendo ampliamente detectados y tienen el potencial de acarrear un impacto ecológico, así como efectos adversos sobre la salud (Kiyama y Wada-kiyama, 2015).

Hoy en día se producen miles de toneladas de EDCs al año que se descargan al medio ambiente por emisión directa o a través de los efluentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales, donde no se eliminan totalmente. Aunque el agua es el compartimento ambiental más afectado, estos contaminantes pueden adsorberse a sedimentos y bioacumularse en organismos (Figura 1). Las vías de exposición más frecuentes en el caso de los seres humanos son la ingestión, inhalación y/o contacto dérmico. La detección de estos contaminantes en el medio ha sido posible sólo recientemente gracias al desarrollo de nuevas y más sensibles tecnologías analíticas (Rahman Kabir y cols., 2015).

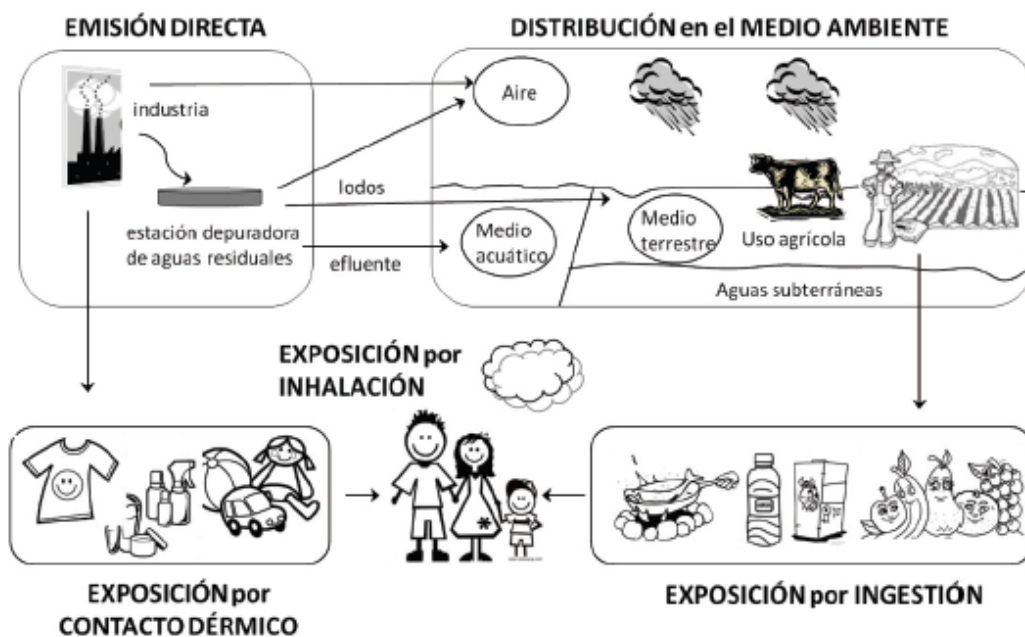


Figura 1. Origen y posible distribución de los EDCs en el medio ambiente (Salgueiro González, 2015).

El Grupo de Trabajo Ambiental (EWG, Environmental Working Group) recientemente publicó una lista de las 12 peores sustancias químicas disruptoras de hormonas con las que podría estar en contacto regularmente:

- Bisfenol-A
- Perclorato
- Arsénico
- Digoxina
- Retardante de fuego
- Sustancias químicas perfluoradas (PFCs, Perfluoroalkyl compounds)
- Atrazina
- Plomo
- Pesticidas organofosforados
- Ftalatos
- Mercurio
- Esteres de glicol

Los EDCs se pueden clasificar según su persistencia en el medio ambiente y sus propiedades químicas y estructurales, tal como se recoge en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de compuestos EDCs.

CLASIFICACIÓN	EJEMPLOS DE EDCs
Compuestos halogenados persistentes y bioacumulativos	
Compuestos orgánicos persistentes (POPs, Persistent Organic Pollutants). Convención de Estocolmo	Policloro dibenzodioxina, olicloro dibenzofuranos, hexaclorobenceno, compuestos perfluorados, polibromodifenileteres, polibromobifenilos, clordano, diclorodifeniltricloroetano/diclorofenildicloroetileno, lindano, endosulfán
Otros compuestos persistentes y bioacumulativos	Hexabromociclododenasos, cloroparafinas de cadena corta, octacloroestireno, policlorobifenilos
Compuestos menos persistentes y menos bioacumulativos	
Plastificantes y otros aditivos para materiales y otros productos	Esteres de Ftalato (Ftalato de bis(2-etilhexilo), trifenil fosfato, Bis(2-etilhexil) adipato, n- butilbenceno, triclocarbano, hidroxianisol butilado
Compuestos policíclicos aromaticos	Benzo (alfa)pireno, Benzo(alfa)antraceno, Pireno, Antraceno
Compuestos fenólicos halogenados	2,4-Diclorofenol, Pentaclorofenol, Hidroxi-Pentaclorobifenilos, Hidroxi-eteres difenilos polibromados, Tetrabromobisfenol a ,2,4,6-Tribromofenol, Triclosan
Compuestos fenólicos no halogenados	Bisfenol A, Bisfenol F, Bisfenol S, Nonilfenol, Octilfenol, Resorcinol

Paralelamente a los estudios ambientales se desarrollan estudios ecotoxicológicos que permiten conocer los efectos de los EDCs en los organismos y establecer un valor límite a partir del cual se garantice la protección del medio. Entre todos los EDCs destacan los estrogénicos, que actúan sobre el sistema reproductor de los individuos. En animales, se ha demostrado que estos compuestos producen descenso de la fertilidad, cambios de sexualidad secundarios o malformaciones en los testículos (Di Donato and cols., 2017). Un claro ejemplo es el caso de la producción de la proteína plasmática vitellogenin (común en los peces hembra) en el hígado de los peces macho (Verderame y Scudiero, 2017). Aunque los efectos demostrados en la salud humana no son tan drásticos, destacan la disminución de la producción de esperma, pubertad temprana y disfunción tiroidea, así como problemas durante el embarazo por la exposición a estos compuestos (Gadzala-Kopciuch y cols., 2008).

2. COMPUESTOS PERFLUORADOS

Dentro del grupo de EDCs con carácter estrogénico destacan los PFCs. Debido a su gran uso en aplicaciones industriales y domésticas, a su ubiquidad y a su elevada toxicidad, los PFCs se consideran contaminantes emergentes en el medio acuático (Armstrong y cols., 2016).

A continuación se exponen las características físico-químicas de estos PFCs, su toxicología y su distribución en el medio ambiente, poniendo de manifiesto la importancia de su análisis en las distintas matrices ambientales.

2.1. Estructuras y usos de los PFCs

Los PFCs tienen una estructura en la que los átomos de hidrógeno de la cadena hidrofóbica son sustituidos por átomos de flúor. El enlace flúor-carbono tiene una profunda influencia sobre las propiedades físicas y químicas, aumentando extremadamente la estabilidad química y térmica de estos compuestos haciéndolos más hidrofóbicos, oleofóbicos y tensioactivos. No son compuestos combustibles, resisten adecuadamente a la acción de ácidos fuertes o compuestos con pH básico, además de ser agentes oxidantes y propensos a la fotólisis. De esta manera permite unos usos y aplicaciones muy interesantes en campos muy diversos como la electrónica, la química y la medicina (Matsuo, 2007).

Se ha confirmado el uso histórico de sustancias relacionadas con los PFCs en los Estados Unidos y en la Unión Europea, en las siguientes aplicaciones:

- Espumas contra incendio
- Alfombras
- Cuero/indumentaria
- Textiles/tapicería
- Papeles y embalajes
- Revestimientos y aditivos para revestimientos
- Productos de limpieza de uso industrial y doméstico
- Plaguicidas e insecticidas

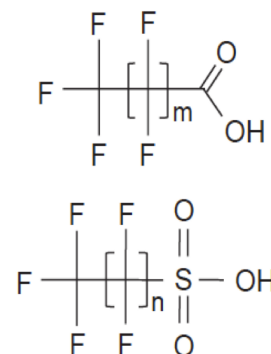
Entre los sectores que actualmente más utilizan sustancias relacionadas con los PFCs destacan:

- Uso del inventario existente de espumas contra incendio
- Industria fotográfica
- Fotolitografía y semiconductores
- Fluidos hidráulicos
- Enchapado metálico

En la Tabla 2, podemos observar la estructura química de los seis PFCs, que se van a estudiar y analizar en este caso.

Tabla 2. Estructura de los PFCs objeto de estudio.

PFC	Sigla	Estructura
Ácido perfluorobutanoico	PFBuA	m= 2
Ácido perfluoropentanoico	PFPeA	m=3
Ácido perfluorohexanoico	PFHxA	m=4
Ácido perfluoroheptanoico	PFHpA	m=5
Ácido perfluorooctanoico	PFOA	m=6
Sulfonato de perfluorooctano	PFOS	m=7



Entre las más estudiadas de estas sustancias figuran el PFOS y el PFOA, que han sido incluidas en el Anexo B del convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes. Una vez conocidos algunos riesgos, se ha ido eliminando su utilización en algunos productos, sustituyéndolas por otras sustancias del grupo. Sin embargo, se han empezado también a detectar posibles problemas con algunas de las sustancias elegidas como sustitutas, pertenecientes al mismo tipo de compuestos. Algunas veces porque su degradación puede originar PFOS o PFOA, otras por los problemas que las sustancias alternativas pueden originar por su mismas.

2.2. Distribución y efectos de la emisión de PFCs en el medioambiente

Una vez liberados al medio ambiente, los PFCs son resistentes a hidrólisis, fotólisis y procesos metabólicos, lo que les hace extremadamente persistentes. Algunos estudios encaminados a estudiar la acumulación y los efectos sobre la salud de animales han demostrado que los PFCs afectan al metabolismo de lípidos, dañan el sistema inmunológico, causan problemas de desarrollo y son cancerígenos, pudiendo causar cáncer de hígado (Das y cols., 2017).

Debe tenerse en cuenta que los PFCs no siguen el patrón “clásico” de partición en tejidos grasos seguido de acumulación, típico de muchos contaminantes orgánicos persistentes. La razón de este fenómeno es que el PFOS es al mismo tiempo hidrofóbico y lipofóbico (Pérez y cols., 2013). En su lugar, el PFOS se une preferentemente a proteínas en el plasma, como la albúmina y las β-lipoproteínas (Kerstner-Wood y cols., 2003), y en el hígado, como las proteínas hepáticas transportadoras de ácidos grasos (Luebker y cols., 2002).

La Agencia de Protección Ambiental de Suecia asignó un estudio de detección, que fue

realizado por el Instituto de Investigaciones Ambientales Aplicadas, sobre los niveles de PFOS en el medio ambiente (EPA Suecia, 2004). Los resultados mostraron niveles muy elevados de PFOS en un humedal cercano a un área de prácticas para la lucha contra incendios. También se detectaron niveles elevados en las descargas de las plantas de tratamiento de aguas residuales y vertederos. Los efluentes de las plantas de tratamiento contenían niveles de PFOS de hasta 0,020 µg/L, y los niveles de lixiviado de los vertederos se encontraban entre 0,038 – 0,152 µg/L.

Con respecto a las concentraciones en sedimentos, se recolectaron muestras de la cuenca del lago Chaohu, en China, para investigar 17 PFCs. Las concentraciones de los PFCs totales (Σ PFCs) en los sedimentos oscilaron entre 0,719 y 2,429 ng/g de peso seco (ps), con un promedio de 1,449 ng/g (ps). Se observó un claro gradiente en la distribución espacial de oeste a este en los sedimentos superficiales del lago Chaohu. El PFOS y PFOA fueron predominantes en sedimentos limnéticos, con un promedio de 0,383 y 0,275 ng/g (ps), respectivamente (Yanjie y cols., 2015).

Habibullah-Al-Mamun y cols. (2016) llevaron a cabo un estudio para cuantificar 15 PFCs en aguas superficiales y sedimentos en la zona costera de Bangladesh. La Σ PFCs en aguas superficiales y muestras de sedimentos estaban en el rango de 10,6 a 46,8 ng/L y 1,07 a 8,15 ng/g (ps), respectivamente. Se encontró que el PFOA en agua (3,17-27,8 ng/L) y PFOS en muestras de sedimento (0,60-1,14 ng/g ps) eran los PFCs más abundantes, y estas concentraciones eran comparables o menores que la mayoría de los otros valores reportados previamente en zonas costeras de China, Japón, Corea y España (Habibullah-Al-Mamun y cols., 2016).

Campo y cols. (2016) evaluaron la presencia, fuentes y partición de 21 PFCs (C4-C14, C16, C18 carboxilato, C4, C6-C10 sulfonatos y C8 sulfonamida) en agua, sedimentos y biota de la cuenca del Júcar. Teniendo en cuenta las tres matrices, el PFPeA y PFOS fueron los compuestos más frecuentes, destacándose la alta incidencia de PFCs de cadena corta ($C \leq 8$), destinados a reemplazar a los de cadena larga en varias industrias y aplicaciones comerciales. En general, todas las muestras estaban contaminadas con al menos un PFCs, con la excepción de tres muestras de peces. Las concentraciones medias detectadas en las muestras de sedimentos (0,22-11,5 ng/g) y biota (0,63-274 µg/kg) fueron mayores que las medidas en agua (0,04-83,1 ng/L), lo que podría sugerir bioacumulación (Campo y cols., 2016).

Diversos trabajos se han enfocado hacia el efecto que producen los PFCs en animales, resultando especialmente afectada la fauna marina. Los daños provocados por los PFCs en estos animales son mucho más evidentes que en los mamíferos. No obstante, la información previa de la que se dispone en cuanto a la presencia y niveles de PFCs y EDCs en organismos

acuáticos es escasa en comparación con las muestras acuosas o el sedimento.

En un estudio previo realizado por Habibullah-Al-Mamun y cols. (2017) reporta la primera evidencia de la ocurrencia de PFCs en pescados y mariscos comúnmente consumidos de la zona costera de Bangladesh. Se midieron 15 PFCs en 48 muestras, 5 peces y 2 especies de mariscos por HPLC-MS/MS. La Σ PFCs en los peces y mariscos estaban en el rango de 0,32-14,58 y 1,31-8,34 (ng/g peso húmedo), respectivamente. El PFOS en el pescado (0,1-3,86 ng/g), mientras que el ácido PFOA en los mariscos (0,07-2,39 ng/g) fueron los PFCs más abundantes. Los resultados fueron comparables con otros estudios llevados a cabo en otras zonas del mundo (China, España, Suecia y EE.UU). La mayoría de los PFCs monitoreados no mostraron variación estacional clara. Sin embargo, los mariscos de la zona sureste (Cox's Bazar y Chittagong) mostraron niveles relativamente más altos de PFCs. Por otra parte, la evaluación de la exposición dietética reveló que la ingesta diaria de PFCs a través del consumo de mariscos eran mucho menos que las guías de salud, lo que indica un bajo riesgo para la salud de los residentes costeros de Bangladesh.

Con estos precedentes en animales, la dispersión de PFCs en el medio ambiente y su exposición es preocupante para la población.

2.3. Técnicas analíticas

Los análisis medioambientales de EDCs están limitados, en numerosas ocasiones, por la metodología analítica disponible para su determinación. Para alcanzar las bajas concentraciones a las que estos compuestos se encuentran en el medio acuático se necesitan métodos de elevada sensibilidad y selectividad, con una etapa de extracción/preconcentración rápida, sencilla y que no requiera gran cantidad de muestra. Además, debido a la complejidad de alguna de las matrices, como sedimentos o biota, se requieren etapas de purificación posteriores, que en muchas ocasiones son tediosas. Por ello, el desarrollo de nueva y eficiente metodología analítica que presente estos requisitos es indispensable para el estudio ambiental de estos contaminantes (Sun y cols., 2017).

2.3.1. Determinación instrumental

La determinación de PFCs puede realizarse mediante cromatografía de gases (GC, gas chromatography) realizando una etapa previa de derivatización que transforme los ácidos perfluorados en derivados más volátiles; formando metil ésteres, isobutil o butil ésteres (Dufková y cols., 2009). Sin embargo, este método no es válido para los PFOS ya que sus ésteres son muy inestables (Moody y Field, 2000). Por esto, aunque algunos PFCs neutros y volátiles como los fluorotelómeros y las sulfonamidas si se pueden analizar directamente

mediante GC (Drever y cols., 2008), y algunos otros tras su derivatización, no es la técnica elegida por la mayoría de los investigadores.

La mayoría de los métodos publicados para la determinación de PFCs, emplean cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS, Liquid chromatography–mass spectrometry). En muchos de estos trabajos se usan disoluciones de acetato de amonio (2-20mM) como fase móvil para incrementar la señal y a sensibilidad del método. El modo de ionización más frecuente es ionización por electrospray (ESI) negativa, aunque en el análisis de muestras medioambientales frecuentemente se produce efecto matriz. Para evitar este problema, Takino y cols. (2003) desarrollaron un método usando ionización a presión atmosférica, pero, aunque evita el efecto matriz, no permite detectar PFOS y presenta límites de detección mayores que los correspondientes usando ESI.

A la hora de desarrollar métodos de análisis para la determinación de PFCs, es conveniente evitar el uso de materiales fabricados a partir de fluorotelómeros, como el PTFE (polytetrafluoroethylene) o teflón, para evitar interferencias en los blancos. Otras fuentes de contaminación en el laboratorio pueden ser los cartuchos SPE de C18, los recipientes de polipropileno o el agua destilada (Villagrasa y cols., 2006).

2.3.2. Técnicas de extracción en matrices acuosas

Entre las técnicas convencionales utilizadas para el análisis de PFCs en aguas destacan la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE) (Boulanger y cols., 2005; Taniyasu y cols., 2005; Yamashita y cols., 2004). A pesar de que con estas técnicas se consiguen buenos resultados, actualmente están siendo sustituidas por otras más sencillas, rápidas, automatizadas y miniaturizadas como las microextracción líquido- líquido (LLME) (Martín y cols., 2015), la microextracción en fase sólida (SPME) (Bach y cols., 2016) o la extracción con barras agitadoras (SBSE) (Aparicio y cols., 2017; Villaverde-de-Sáa y cols., 2012).

Estas nuevas metodologías son sostenibles, también llamadas “verdes”, lo que indica que se reduce la cantidad de reactivos tóxicos utilizados durante todo el procedimiento experimental, el consumo de energía o la generación de residuos; es decir, que cumplen los principios de la Química Verde.

2.3.3. Técnicas de extracción en matrices sólidas

Existe un gran número de métodos analíticos para la determinación de estos compuestos en matrices sólidas (como los lodos generados en las estaciones depuradas de aguas residuales) que probablemente puedan ser empleados para el análisis de suelos y/o sedimentos con alguna modificación; sin embargo, la cantidad de métodos desarrollados y validados para el

análisis de PFCs en biota es mucho menor.

Entre las técnicas de extracción más utilizadas para el análisis de los PFCs bajo estudio en matrices sólidas destacan la extracción asistida con energía de ultrasonidos (USE) (Pan y cols., 2010; Higgins y cols., 2005) y la extracción con líquidos a presión (PLE) (Lorca y cols., 2011; Schröder, 2003). Con ellas se consigue reducir el consumo de reactivos, la generación de residuos y el tiempo de análisis; además, se reduce la manipulación de la muestra por parte del analista (automatización de las técnicas) minimizando también la posible contaminación.

En la mayoría de los casos, y debido a la complejidad de la matriz, la etapa condicionante del análisis de microcontaminantes en biota suele ser la purificación, con la que se pretende eliminar interferentes (especialmente lípidos) que puedan influir en el análisis y dañar el sistema cromatográfico (Shao y cols., 2007). Existen diferentes técnicas de purificación de matrices sólidas, siendo las más comunes aquellas en las que se utilizan adsorbentes (como Florisil® o octadecilsilano) (Felizeter y cols., 2012; Vestergren y cols., 2012).

En la Tabla 3 se recogen distintos métodos analíticos encontrados en la bibliografía entre 2002 y 2017 para la determinación de PFCs en matrices ambientales junto con algunas propiedades analíticas de cada uno de ellos.

Tabla 3. Metodología analítica para la determinación de PFCs en matrices ambientales.

MUESTRA	TÉCNICA DE EXTRACCIÓN	DETERMINACIÓN	LÍMITES DE DETECCIÓN	REFERENCIA
Agua	SPE	LC-MS/MS	0,4-5,2 pg/L	(Yamashita y cols., 2004)
Agua	SPE	LC-MS/MS	0,01-1 ng/L	(Taniyasu y cols., 2005)
Agua Residual	SPE	LC-MS/MS	2-8 ng/L	(Boulanger y cols., 2005)
Sedimento	US	LC-MS/MS	0,011–0,246 ng/g	(Higgins y cols., 2015)
Sedimento	US	LC-MS/MS	0,01–0,1 ng/g	(Pan y cols., 2010)
Lodo	PLE-SPE	LC-MS/MS	6-10 ng/kg	(Schöder, 2003)
Lodo	PLE-SPE	LC-MS/MS	15-79 ng/kg	(Llorca y cols., 2011)

2.4. Regulación

2.4.1. Salud pública

Se han empezado a regular los PFCs que se han utilizado más, y los que se ha visto que producían efectos sobre la salud: PFOS y PFOA, compuestos persistentes en el ambiente que detectan en muestras de sangre por todo el mundo debido a exposición por contacto dérmico o bien exposición por ingestión de los mismos. Pero sólo están regulados por algunos organismos oficiales, como la agencia europea de seguridad alimentaria (EFSA), la cual teniendo en cuenta estudios toxicológicos ha establecido valores de ingesta diaria (TDI) definida como cantidad de contaminante presente en alimentos o agua de bebida que puede ser ingerida todos los días durante toda la vida sin que suponga riesgos apreciables para la salud (EFSA, 2013), siendo 150 ng y 1500 ng para el PFOS y PFOA, respectivamente, por kilogramo corporal. De esta manera se mantiene un margen suficiente de seguridad para los consumidores, incluidos aquellos subgrupos más sensibles, como los niños.

Una gran mayoría están relacionados con los envoltorios de los alimentos, pero todavía estamos estudiando qué tipos de envases son los que más llevan. De momento no podemos generalizar, pero se puede tratar de reducirlos. Por ejemplo, en el caso de las frutas y verduras, mejor comprarlas al por mayor que no envasadas. Y evitar la comida rápida con muchos envoltorios. También sería bueno reducir el uso de disolventes en la casa, y los productos de teflón. Y con el tiempo, estoy seguro de que los PFCs se acabarán regulando. No hay que preocuparse por la calidad del agua del grifo, porque pasa muchos controles y muchos tratamientos que garantizan que no conlleva ningún efecto negativo para la salud de las personas. La de río ya es otra cosa, porque se han detectado muchas sustancias que podrían ser un riesgo.

2.4.2. Ámbito medioambiental

La Directiva Marco de Agua (WFD 2000/60/CE) surge en el año 2000 con el objetivo de, entre otros, alcanzar un “buen estado” ecológico y químico de las aguas superficiales y continentales de los Estados Miembros de la Unión Europea antes de 2015, preservando así la biodiversidad del medio acuático y protegiendo la salud humana (Directiva-2000/60).

Para evaluar la calidad de las aguas, la WFD establece distintos parámetros físico-químicos y biológicos que han de ser considerados como marcadores de contaminación. En lo referente a la contaminación química, la directiva enumera la lista de las 33 sustancias prioritarias en política de aguas que, por su ubiquidad y toxicidad, suponen un peligro para el medio acuático. Es la Directiva 2008/105/CE la que, años más tarde, establece unos valores límites

denominados Normas de Calidad Ambiental (NCA) para estas sustancias prioritarias. Estas NCA se expresan mediante dos parámetros: la media anual y la concentración máxima admisible. En algunos casos, ésta última no se aplica pues se considera que los valores fijados por la media anual son lo bastante bajos para proteger el medio acuático a corto plazo.

Por otra parte, y para cada sustancia prioritaria, las NCA se establecen diferenciando dos grupos de aguas: 1) las aguas superficiales continentales que incluyen ríos, lagos y masas de agua artificiales y 2) otras aguas superficiales. Además, en el Anexo III se recoge un grupo de posibles sustancias que podrían ser consideradas como contaminantes prioritarios en un futuro, entre las que se encuentra el bisfenol A.

Desde entonces, el “buen estado químico” de las aguas se evalúa comparando las concentraciones de los contaminantes en las aguas analizadas con el NCA correspondiente. De esta manera, si se superan los valores establecidos en la legislación no se puede garantizar la protección del medio acuático. Sin embargo, el avance en los estudios eco-toxicológicos y medioambientales ha puesto de manifiesto la necesidad de modificar los valores límite de algunas sustancias existentes, así como añadir otras sustancias que antes no estaban consideradas.

La Directiva 2013/39/UE, que modifica a las antes mencionadas, incluye nuevos contaminantes y hace más restrictivas los valores límite en aguas para algunos compuestos (Directiva-2013/39). En la citada directiva se incluyeron 12 nuevas sustancias prioritarias, que se suman a las 33 previamente publicadas, entre los nuevos contaminantes se incluyen biocidas, pesticidas, PFCs (PFOS y sus derivados) o retardantes de llama bromados (hexabromociclododecano), entre otros (Tabla 4).

Además de analizar las aguas, el estado del medio acuático puede evaluarse estudiando la presencia de las sustancias prioritarias en sedimento y/o biota. La elección de una u otra matriz complementaria dependerá de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos bajo estudio (European-Commission, 2010). Existen guías técnicas sobre la implementación de las NCA que recomiendan la monitorización de algunas de las sustancias peligrosas en sedimentos, sin embargo la Directiva 2013/39/UE no recoge valores límite para esta matriz pero si las incluye en biota para algunos compuestos, como los estudiados en dicho trabajo.

En cualquier caso, la legislación va muy lenta. Primero hay que hacer las investigaciones y obtener resultados claros, demostrar que hay efectos, y después aún se tarda años hasta que se plasman en leyes. Entre otras cosas, por las presiones de las empresas que fabrican los productos. Y, además, hay que tener en cuenta que cuando se prohíbe una sustancia normalmente se sustituye por otra que, a la larga, también puede resultar tóxica.

Tabla 4. Normas de calidad ambiental para las sustancias prioritarias y algunos otros contaminantes (Directiva 2013/39/UE).

«ANEXO I							
NORMAS DE CALIDAD AMBIENTAL PARA LAS SUSTANCIAS PRIORITARIAS Y ALGUNOS OTROS CONTAMINANTES							
PARTE A: NORMAS DE CALIDAD AMBIENTAL (NCA)							
MA:		media anual					
CMA:		concentración máxima admisible					
Unidad:		[µg/l] para las columnas (4) a (7)					
		[µg/kg de peso húmedo] para la columna (8)					
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Nº	Nombre de la sustancia	Nº CAS ⁽¹⁾	NCA-MA ⁽²⁾ Aguas superficiales continentales ⁽³⁾	NCA-MA ⁽²⁾ Otras aguas superficiales	NCA-CMA ⁽⁴⁾ Aguas superficiales continentales ⁽³⁾	NCA-CMA ⁽⁴⁾ Otras aguas superficiales	NCA Biota ⁽¹²⁾
(35)	Ácido perfluorooctanosulfónico y sus derivados (PFOS)	1763-23-1	$6,5 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4}$	36	7,2	9,1

3. OBJETIVOS

De acuerdo con los antecedentes anteriormente descritos, el objetivo principal de este trabajo es: proponer un método analítico para la determinación simultánea de seis compuestos perfluorados en organismos marinos (*Holothuria tubulosa*) y llevar a cabo un programa de monitorización ambiental para el seguimiento de estos compuestos en organismos procedentes de la costa granadina.

Para la consecución de los objetivos pretendidos, a continuación se detalla el plan de trabajo distribuido por actividades y tareas encadenadas en el tiempo:

- 1) Revisión bibliográfica sobre las fuentes, destino y efectos de PFCs en el medio ambiente, así como de las estrategias analíticas empleadas para su determinación en distintas matrices.

Se han consultado revistas científicas electrónicas a través de las bases de datos de Science direct o Scopus. Estas bases de datos nos han sido de gran utilidad ya que hemos encontrado artículos de gran impacto. Una vez dentro de las bases de datos se ha podido hacer una selección de búsqueda en la cual se puede indicar las palabras clave del tema de interés, los años de las publicaciones, los autores, la tipología de la

publicación o incluso una revista específica. En este caso se ha realizado la revisión sobre artículos desde el 1999 hasta la actualidad, usando como herramienta diversos descriptores: “Endocrine Disruptor Compounds”, “Perfluoroalkyl Compounds”, “Environment”, “Analytical Methodology” “Chromatography”, “Fate” o “biota”.

También, hemos consultado tesis doctorales de diferentes autores relevantes en el estudio de EDCs en el medio ambiente (María Muñoz Ortuño, Junio 2015; María Pilar Martínez Moral, 2015; José Robles Molina, Mayo 2014; o Laura Segovia Martínez, Octubre 2014; Noelia Salgueiro González, Julio 2013)

- 2) Puesta a punto de una metodología analítica para la determinación simultánea de seis PFCs en equinodermos marinos mediante extracción con disolventes, limpieza del extracto por extracción en fase sólida dispersiva y posterior determinación mediante cromatografía de líquidos con detección de espectrometría de masas de triple cuadrupolo.
- 3) Evaluación cuantitativa de la exposición de los PFCs en organismos marinos y determinar la calidad de las costas en base a las exigencias fijadas por la Directiva Marco del Agua en cuanto a la presencia de estos contaminantes en biota.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Organismos de ensayo

Las holoturias u holoturoideos, conocidos vulgarmente como pepinos de mar o carajos de mar, son una clase del filo Equinodermos que incluye animales de cuerpo vermiforme alargado y blando que vive en casi todos los ambientes marinos, pero son más diversos en las aguas saladas poco profundas de los arrecifes coralinos. Habitan desde el medio intersticial, donde pueden quedar expuestos en la marea baja, hasta las profundas fosas oceánicas. Muchas especies viven enterradas en sedimentos blandos, siendo por tanto bentónicas; pero muchas pueden nadar, y algunas incluso son miembros del plancton, flotando a merced de las corrientes. Se conocen unas 1.400 especies.

Pertenece al mismo grupo (Echinodermata) que los erizos de mar o las estrellas de mar aunque aparentemente no tienen la simetría pentarradial característica de los demás representantes de este grupo. Se consideran animales con una simetría bilateral secundaria, ya que internamente sus órganos y sistemas aparecen en un número múltiplo de 5, como en el resto de equinodermos, pero externamente su cuerpo alargado da la sensación de tener un

solo eje de simetría. El cuerpo es musculoso, en forma de cilindro, y tiene una apertura bucal por un extremo que es rodeada por tentáculos como podemos apreciar en la Figura 2. En el otro extremo se halla la abertura anal.

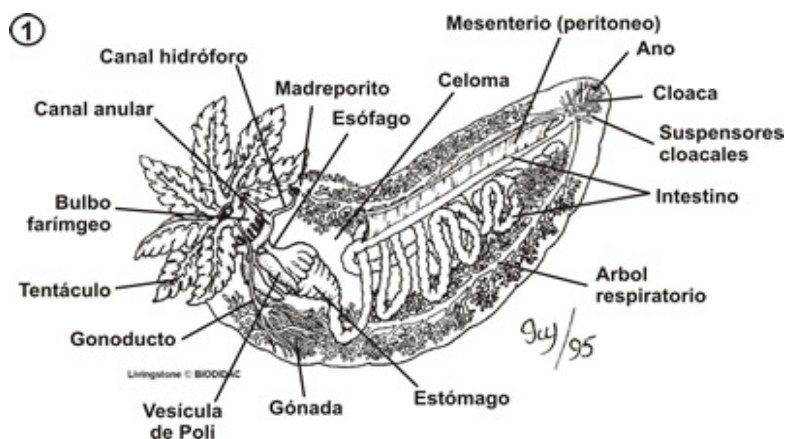


Figura 2- Esquema de la estructura corporal de Holoturia (www.asturnatura.com/articulos/equinodermos/holoturias.php).

Se alimentan de detritos, algas, en algunos casos de plancton y su reproducción puede ser tanto por vía sexual como asexual.

En estudios previos, estos animales han sido objeto de estudio principalmente de metales y compuestos orgánicos como bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos y algunos disruptores endocrinos (alquilfenoles, especies derivadas del estaño o bisfenol A) pudiendo comprobarse que, efectivamente, sus órganos muestran tendencia a la bioacumulación (Goutte y cols., 2013; Arslan y cols., 2007; Bellas y cols., 2005; Novelli y cols., 2002). Sin embargo, y según la extensa bibliografía consultada, ninguno de estos estudios se centra en los contaminantes seleccionados en la presente propuesta.

4.2. Toma de muestra

Los especímenes de *Holothuria tubulosa* (n = 10) fueron tomadas a mano por buceadores en ubicaciones aleatorias, a lo largo de un transecto de 50 m de largo y 7-13 m de profundidad en la zona infralitoral de la playa de Marina del Este (Almuñecar, sur de España, coordenadas: 36.720528, -3.728383) en el mes de Marzo de 2017. Las muestras fueron de tamaño similar (promedio de 100 g).

Una vez en el laboratorio, antes de la disección con bisturí, las holoturias se lavaron con agua destilada para eliminar la materia extraña y la suciedad. Para los análisis, se utilizaron los tractos digestivos, el árbol respiratorio y las gónadas (Figura 3). Las vísceras fueron liofilizadas, homogeneizadas y tamizadas en polvo. Cada muestra se transfirió a un frasco de vidrio y se almacenaron en el congelador (-20 °C) para evitar el deterioro hasta el análisis.



Figura 3. Disección con bisturí de una holoturia.

5. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

El método se basa en la extracción de los contaminantes mediante extracción asistida por ultrasonidos, limpieza del extracto por extracción en fase sólida dispersiva y posterior determinación mediante cromatografía de líquidos con detección de espectrometría de masas de triple cuádruplo (LC-MS/MS).

5.1. Instrumentación

Cromatógrafo de líquidos

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con bomba binaria de alta presión, inyector automático y compartimento termostatzado para la columna.
- Detector de espectrometría de masas triple cuádruplo (QqQ-MS) equipado con fuente de ionización por electrospray.
- Columna Halo C18 (50 x 4.6 mm i.d., 1,8 μ m).

Otros equipos

- Liofilizador
- Baño de ultrasonidos

- Balanza analítica de 0,1 mg de precisión
- Centrífuga
- Micropipetas de volúmenes variables comprendidos entre los 25 y 1000 μL
- Sistema de obtención de agua ultrapura
- Sistema para evaporación con corriente de nitrógeno

Otro material de laboratorio

- Agujas desechables
- Mortero de ágata
- Sistema de filtración
- Tamiz de paso de malla de 0,1 mm
- Filtros de membrana de nylon 0,22 μm
- Filtros de nylon de 0,22 μm para jeringas
- Jeringas desechables
- Tubos de centrífuga de 10 mL de fondo cónico
- Viales de 2 mL para inyector automático

5.2. Reactivos**Patrones**

Todos los patrones comerciales empleados en la determinación deben ser de una pureza, como mínimo, superior al 97 %. Los patrones empleados son los siguientes:

- Ácido perfluorobutanoico, PFBuA
- Ácido perfluoropentanoico, PFPeA
- Ácido perfluorohexanoico, PFHxA
- Ácido perfluoroheptanoico, PFHpA
- Ácido perfluorooctanoico, PFOA
- Ácido perfluorooctanosulfónico, PFOS
- Ácido perfluorooctanoico $^{13}\text{C}_4$ (patrón interno)

Otros reactivos

- Acetonitrilo
- Acetato amónico
- Agua ultrapura calidad HPLC
- Metanol calidad HPLC
- Sorbente sólido C18 (Octadecyl) (40 μm)

5.3. Procedimiento

Calibración

- *Preparación de los patrones*

Preparar los patrones del calibrado conteniendo 100 µg/L de patrón interno y concentraciones de PFCs en los rangos de concentración 0,01 a 500 µg/L. Emplear una mezcla metanol:agua (1:1 v/v) como disolvente.

- *Rectas de calibrado*

Se realizarán a partir de las áreas de pico de los cromatogramas MRM (Multiple Reaction Monitoring) empleando el método del patrón interno.

Tratamiento de la muestra

- Medir con precisión 0,5 g de muestra, previamente liofilizada y tamizada a un tamaño de partícula de 0,1 mm.
- Añadir 100 µL de una disolución de patrón interno de 250 ng/mL
- Adicionar a la muestra 7 mL de acetonitrilo y agitar en el vórtex durante 2 min y posterior extracción asistida por ultrasonidos durante 10 min.
- Seguidamente se introduce en la centrifuga durante 10 min a 4000 rpm.
- El sobrenadante se recoge en tubos de ensayo y se repite el proceso otra vez, para realizar dos extracciones, obteniendo un volumen final aproximado de 14 mL.
- Al volumen extractante se le añade 0,8 g de C18 y se agita durante 2 min.
- Se introduce en la centrifuga 15 min a 4000 rpm.
- El sobrenadante es recogido en un tubo de ensayo.
- Evaporar a sequedad el extracto con corriente de nitrógeno y reconstituir por adición de 0,25 mL de una mezcla metanol:agua 1:1 (v/v).
- Filtrar el extracto (0,22 µm).

Preparación del blanco

Preparar dos blancos de reactivos en cada serie de medidas.

Análisis cromatográfico

- *Condiciones cromatográficas*

- Flujo de fase móvil: 0,6 mL/ min.
- Temperatura de columna: 30 °C.
- Columna Halo C18 (50 x 4,6 mm i.d., 1,8 µm).

- Fase móvil: mezcla de metanol (fase orgánica) y disolución acuosa de acetato amónico 10 mM (fase acuosa) siguiendo el programa de elución de la Tabla 5.

Tabla 5. Programa de elución para la separación cromatográfica.

Tiempo (min)	Fase orgánica (% v/v)	Fase acuosa (% v/v)
0	28	72
14	70	30
19	80	20
20	28	72
26	28	72

- Detección:

En la Tabla 6 se muestran los valores de los parámetros QqQ-MS optimizados para la detección de cada uno de los compuestos.

Tabla 6. Parámetros optimizados para la determinación de los PFCs.

PFC	Tiempo de retención (min)	Ión precursor (m/z)	MRM 1 (cuantificación)	MRM 2 (confirmación)	Fragmentor (V)	Energía de colisión (V)
PFBuA	3,21	213[M-H] ⁻	213>169	213>51,6	55	0
PFPeA	6,95	263[M-H] ⁻	263>219	263>69	68	0
PFHxA	10,00	313[M-H] ⁻	313>269	313>119	60	0
PFHpA	12,11	363[M-H] ⁻	363>318,9	363>168,9	68	0
PFOA	13,70	413[M-H] ⁻	413>369	413>169	68	40
PFOS	14,99	499[M-H] ⁻	499>80	499>51,5	145	40

5.4. Expresión de resultados

Cálculo de concentraciones

La cuantificación se llevará a cabo por interpolación de las relaciones de área, las del pico del analito y las del patrón interno, obtenidas en los cromatogramas, en las correspondientes rectas de calibrado. A continuación se tendrá en cuenta la preconcentración de la muestra durante el tratamiento y la eficacia del método analítico.

5.5. Validación del método

Recuperación

La recuperación del método se evaluará sobre muestras de biota dopadas. Se prepararan por triplicado muestras dopadas y blancos y se compararan las áreas de pico obtenidas en las muestras dopadas con las obtenidas en extractos de muestras, dopados tras el proceso de extracción. Las recuperaciones obtenidas se muestran en la Tabla 7.

Precisión

Se realizará por triplicado sobre muestras de biota dopadas. La precisión se expresará como desviación estándar relativa de las medidas realizadas. Los datos de precisión obtenidos para los distintos compuestos se muestran en la Tabla 7.

Límites de detección y cuantificación

- Límite de detección

Se expresará como la concentración para la cual la relación señal-ruido tiene un valor de 3. Los límites de detección de los distintos compuestos se muestran en la Tabla 7.

- Límite de cuantificación

Se expresará como la concentración para la cual la relación señal-ruido tiene un valor de 10. Los límites de cuantificación de los distintos compuestos se muestran en la Tabla 7.

Rango de linealidad

Se prepararán por triplicado nueve patrones de diferente concentración en los rangos de concentración indicados en la sección de calibración. Se representará la relación entre el área de pico del analito y el área de pico del patrón interno frente a la concentración. Se evaluará la linealidad a partir del valor de coeficiente de correlación de la recta de calibrado obtenida por el método de los mínimos cuadrados. El valor del coeficiente de correlación deberá ser superior a 0.990.

Tabla 7. Recuperación, precisión, linealidad y límites de detección (LD) y cuantificación (LC) del método.

PFCs	Recuperación (%)	Precisión (% RSD)	Linealidad R ²	LD (µg/kg ps)	LC (µg/kg ps)
PFBuA	101	0,2	0,998	0,01	0,03
PFPeA	99	8,0	1,000	0,01	0,03
PFHxA	94	8,5	0,999	0,01	0,03
PFHpA	92	5,7	0,999	0,01	0,03
PFOA	84	1,8	0,999	0,01	0,03
PFOS	85	9,4	0,995	0,01	0,03

En la Figura 4 se muestra un esquema del procedimiento analítico seguido para la cuantificación de PFCs en holoturias.



Figura 4. Procedimiento analítico para el análisis de PFCs en muestras de holoturia.

6. MONITORIZACIÓN DE PFCs EN HOLOTHURIA TUBULOSA

Tras la validación del método, las muestras fueron tratadas como se describe en la sección 5 y se determinó la concentración de los analitos de interés bajo las condiciones establecidas. El análisis se realizó en todos los casos por duplicado. En la Tabla 8 se presentan los resultados medios obtenidos y en las Figuras 5 y 6 un cromatograma de una disolución patrón y una muestra de holoturia, respectivamente.

Tabla 8. Concentraciones de PFCs (ng/g (ps)) medidas en holothurias.

Holothuria	PFBuA	PFPeA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFOS
H1	9,19	5,07	32,7	162	179	25,0
H2	7,58	4,81	31,6	159	172	23,1
H3	5,22	0,81	11,7	56,7	51,5	3,01
H4	4,61	1,41	11,6	53,2	51,3	2,41
H5	1,59	<LC	2,60	11,5	25,1	10,1
H6	1,99	<LC	2,60	11,0	24,4	9,84
H7	37,2	31,9	6,52	17,3	65,5	72,8
H8	34,7	31,2	6,69	17,3	64,6	72,9
H9	55,4	26,3	141	271	668	95,1
H10	48,9	78,1	174	484	151	21,3

Los resultados demuestran la incorporación de estos contaminantes emergentes en dichos organismos todas las muestras dieron positivos en el análisis de los contaminantes con concentraciones desde 0,81 ng/g (ps) para el PFPeA hasta 668 ng/g (ps) para el PFOA. De manera general, los compuestos perfluorados de mayor cadena fluorocarbonada fueron cuantificados a concentraciones más elevadas que los de cadena corta, fundamentalmente PFOS y PFOA. Estas altas concentraciones se pueden explicar debido al gran uso de productos de limpieza, plaguicidas e insecticidas, textiles, embalajes revestimiento de aditivos etc los cuales aumentamos el uso cotidiano.

Las concentraciones obtenidas en el estudio fueron comparadas con las encontradas en la literatura, teniendo en cuenta distintas matrices. En la tabla 9 se puede observar las concentraciones según la matriz, la localización y el año en el que fueron tomadas las mismas.

Tabla 9. Concentraciones (ng/g o ng/L) de PFCs obtenidas de la literatura en distintas matrices analizadas.

MATRIZ	PFBuA	PFPeA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFOS	LOCALIZACIÓN	AÑO	REFERENCIA
Biota: <i>Holoturia</i> <i>Tubulosa</i>	1,59-48,9	<L.D-78,1	2,60-174	11,5-484	24,4-668	3,01-95,1	Granada (España)	2017	Este documento
Biota: Peces	N.D	9,84-946	N.D	1,18-111	N.D	0,56-8,13	Rio Júcar (España)	2010	Campo et al., 2016
Biota: Anguila	0-61,5	0-0,06	-	0-0,12	0-0,54	0-7,81	Lago Garda (Italia)		Chiesa et al., 2017
Biota	0,08-20,6	8,53-9,69	48,1-1740	38,3-39,7	19,6-31,4	17,9-530	Llobregat (España)	2010	Campo et al., 2015
Biota: Oso polar (hígado)	-	-	-	-	-	1700->4000	Ártico Canadiense	2004	Martin et al., 2004
Biota: Visón (hígado)	-	-	-	-	-	40-4870	E.E.U.U.	2001	Giesy y Kannan, 2001
Biota: Foca (hígado)	-	-	-	-	-	10-1520	Golfo de Botnia (Finlandia)	2002	Kannan et al., 2002
Biota: Ángila Calva (plasma)	-	-	-	-	-	1-2570	Golfo de México (E.E.U.U.)	2001	Giesy y Kannan, 2001

Sedimento	-	-	-	-	0,11-0,93	<0,15-0,38	Mar de la China Oriental (China)	2014	Wang et al., 2017
Sedimento	-	-	-	-	0,01-0,43	0,02-5,36	Bahía alemana (Alemania)	2011	Wang et al., 2017
Sedimento	0,61-12,9	0,26-1,06	N.D	0,38-0,38	0,36-1,52	0,15-11,4	Llobregat (España)	2010	Campo et al., 2015
Agua superficial	0,07-111	0,08-2,50	0,67-25,2	0,63-30,9	0,07-146	0,01-2710	Llobregat (España)	2010	Campo et al., 2015
Agua superficial	-	-	-	-	0,07-0,43	0,23-5,36	Bahía alemana (Alemania)	2011	Wang et al., 2017
Agua superficial	-	-	-	-	0,21-0,90	N.D-0,04	MAMar de la China Oriental (China)	2014	Quian-WenWan et al., 2017

N.D.: No detectado

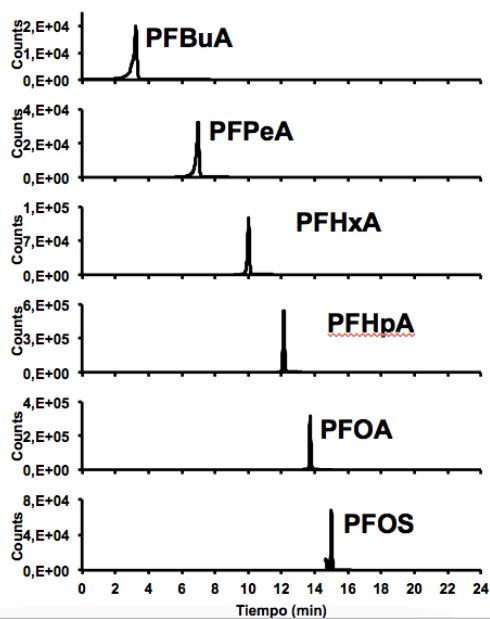


Figura 5. Cromatograma obtenido de muestra de *Holothuria tubulosa*

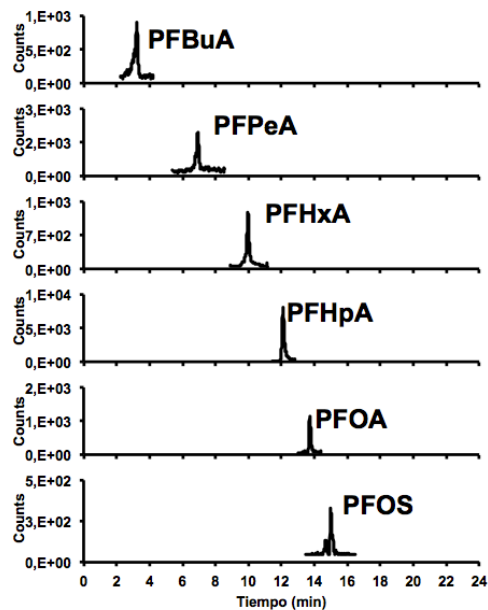


Figura 6. Cromatograma obtenido de una disolución patrón.

De la tabla se observa que los PFCs más monitorizados son los de cadena larga, entre los que se encuentran el PFOS y PFOA. Como se menciona en la introducción de este trabajo, ambos compuestos, según estudios recientes, son tóxicos y persistentes, el PFOA es además carcinogénico, y el PFOS presenta una fuerte tendencia a la bioacumulación.

También se aprecian concentraciones más elevadas en la matriz biota que en el agua superficial o el sedimento, lo que podría indicar una posible bioacumulación de dichos compuestos en los organismos marinos. Son contaminantes persistentes, porque son compuestos muy estables y cuestan mucho de destruir químicamente. Pueden durar años, y van pasando a través de los diferentes estadios de la cadena alimentaria: desde el agua entran en los animales, y siguen la cadena trófica. Sin embargo, también cabe destacar que según la localización la concentración varía independiente de la matriz, esto se debe a la cercanía de dichas matrices a lugares contaminados, como es el caso de los países tropicales donde se observan mayor concentración de dichos compuestos (Giesy y Kannan, 2001).

Existen dos razones para que estos compuestos se encuentren tan extendidos en la Tierra: La primera es que desde hace 60 años estos compuestos se han utilizado en productos tan cotidianos como las sartenes antiadherentes (el famoso Teflón), en la ropa “waterproof”, en cosméticos, en cajas de pizza o en los envases de palomitas de maíz. Los PFCs migran desde estos productos al aire, al polvo de casa, la comida o el agua potable. La segunda razón de su ubicuidad es que los PFCs son compuestos orgánicos persistentes, es decir, son compuestos que no se degradan fácilmente por lo que permanecen en el entorno años y que, además, se acumulan a lo largo de la cadena alimentaria.

7. CONCLUSIONES

- Los EDCs están en el punto de mira de estudios ambientales y ecotoxicológicos. Entre ellos destacan los PFCs, tanto por su amplio uso industrial y doméstico como por su elevada actividad estrogénica demostrando efectos adversos a niveles traza. Se descargan al medio ambiente a través de efluentes industriales y de estaciones depuradoras de aguas residuales afectando principalmente a organismos marinos donde pueden acumularse si se produce una exposición a largo plazo.
- El análisis de PFCs en muestras medioambientales requiere de herramientas analíticas con una alta capacidad de separación y lo suficientemente sensibles como para detectar concentraciones del orden de las partes por billón. La cromatografía líquida de alta resolución acoplada con detector de espectrometría de masas ha sido la más frecuentemente utilizadas para la determinación de estos contaminantes.
- En este TFG, se pone a punto una metodología analítica para la determinación simultánea de seis PFCs en organismos marinos (*Holothuria tubulosa*) consistente en la extracción de los contaminantes mediante disolventes, limpieza del extracto por extracción en fase sólida dispersiva y posterior determinación mediante cromatografía de líquidos con detección de espectrometría de masas de triple cuadrupolo.
- Se validó la metodología obteniendo parámetros analíticos satisfactorios. Las recuperaciones obtenidas se situaron en el rango de 84 a 101 % con desviaciones estándar relativas inferior a 9 % y límites de cuantificación inferior a 0,03 ng/g (ps).
- Todas las muestras dieron positivas en el análisis de los contaminantes. Los resultados obtenidos muestran concentraciones entre 667 ng/g (ps) para el PFOA y 0,81 ng/g (ps) para el PFPeA. De manera general, los compuestos perfluorados de mayor cadena fluorocarbonada fueron cuantificados a concentraciones más elevadas que los de cadena corta. Estos resultados preliminares muestran la necesidad de futuros estudios para conocer su comportamiento y sus efectos, a fin de preservar la biodiversidad y proteger la salud pública.

8. REFERENCIAS

- Alzaga R, Bayona JM. Determination of perfluorocarboxylic acids in aqueous matrices by ion-pair solid-phase microextraction-in-port derivatization-gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2004; 1042(1-2): 155-62.
- Aparicio I, Martín J, Santos JL, Malvar JL, Alonso E. Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography–tandem massspectrometry determination of polar and non-polar emerging andpriority pollutants in environmental waters. *J Chromatogr A*. 2017; 1500: 43-52.
- Armstrong DL, Lozano N, Rice CP, Ramirez M, Torrents A. Temporal trends of perfluoroalkyl substances in limed biosolids from a large municipal water resource recovery facility. *J Environ Manage*. 2016; 165: 88-95.
- Arslan AC, Parlak H, Oral R, Katalay S. The effects of nonylphenol and octylphenol on embryonic development of sea urchin (*Paracentrotus lividus*). *Arch Environ Cont Toxicol*. 2007; 53: 214–219.
- Bach C, Boiteux V, Hemard J, Colin A, Rosin C, Munoz JF et al. Simultaneous determination of perfluoroalkyl iodides, perfluoroalkane sulfonamides, fluorotelomer alcohols, fluorotelomeriodides and fluorotelomer acrylates and methacrylates in water and sediments using solid-pase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2016; 1448: 98-106.
- Bellas J, Beiras R, Maríño-Balsa JC, Fernández N. Toxicity of organic compounds to marine invertebrate embryos and larvae: a comparison between the sea urchin embryogenesis bioassay and alternative test species. *Ecotoxicology* 2005; 14: 337–353.
- Benigni R, Battistelli CL, Bossa C, Giuliani A, Tcheremenskaia O. Endocrine Disruptors: Data-based survey of in vivo tests, predictive models and the Adverse Outcome Pathway. *Regul Toxicol*. 2017; 86: 18-24.
- Boulanger B, Vargo JD, Schnoor JL, Hornbuckle KC. Evaluation of Perfluorooctane Surfactants in a Wastewater Treatment System and in a Commercial Surface Protection Product. *Environ Sci Technol*. 2005; 39(15): 5524-30.
- Campo J, Lorenzo M, Pérez F, Picó Y, Farré M, Barceló D. Analysis of the presence of perfluoroalkyl substances in wáter, sediment and biota of the Jucar River (E Spain). Sources, partitioning and relationship with wáter physical characteristics. *Environ Res*. 2016; 147: 503-12.

- Campo J, Lorenzo M, Pérez F, Picó Y, Farré M, Barceló D. Analysis of the presence of perfluoroalkyl substances in water, sediment and biota of the Jucar River (E Spain). Sources, partitioning and relationships with water physical characteristics. *Environ Res.* 2016; 147: 503-12.
- Campo J, Pérez F, Masiá A, Picó Y, Farré M, Barceló D. Perfluoroalkyl substance contamination of the Llobregat River ecosystem (Mediterranean area, NE Spain). *Sci Total Environ.* 2015; 503-504: 48-57.
- Chiesa LM, Nobile M, Pasquale E, Balzaretto C, Cagnardi P, Tedesco D et al. Detection of Perfluoroalkyl Acids and Sulphonates in Italian Eel Samples by HPLC-HRMS Orbitrap. *Chemosphere.* 2018; 193: 358-64.
- Das K P, Wood C R, Lin M T, Starkov A A, Lau C, Wallace K B et al. Perfluoroalkyl acids-induced liver steatosis: Effects on genes controlling lipid homeostasis. *Toxicol.* 2017; 378: 37-52.
- Di Donato M, Cerneria G, Giovannelli P, Galasso G, Bilancio A, Migliaccio A et al. Recent advances on bisphenol-A and endocrine disruptor effects on human prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2017; 457: 35-42.
- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. DOCE, L 327/1.
- Directiva 2008/105/CE del Parlamento y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/208/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. DOUE, L 348/84.
- 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. DOUE, L 226/1.
- Dreyer A, Temme C, Sturm R, Ebinghaus R. Optimized method avoiding solvent-induced response enhancement in the analysis of volatile and semi-volatile polyfluorinated alkylated compounds using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2008; 1178(1-2): 199-205.
- Dufková V, Cabala R, Maradová D, Stícha M. A fast derivatization procedure for gas chromatographic analysis of perfluorinated organic acids. *J Chromatogr A.* 2009; 1216: 8659-64.
- Felizeter S, McLachlan MS, de Voogt P. Uptake of Perfluorinated Alkyl Acids by Hydroponically Grown Lettuce (*Lactuca sativa*). *Environ Sci Technol.* 2012; 46(21): 11735-43.

- Giesy JP, Kannan K. Global Distribution of Perfluorooctane Sulfonate in Wildlife. *Env Sci Tech.* 2001; 35: 1339-42.
- Goutte A, Chevreuil M, Alliot F, Chastel O, Cherel Y, Eléaume M, Massé G. Persistent organic pollutants in benthic and pelagic organisms off Adélie Land, Antarctica. *Mar Poll Bull.* 2013; 77: 82–89.
- Habibullah-Al-Mamun Md, Kawser Ahmed Md, Raknuzzaman M, Saiful Islam Md, Negishi J, Nakamichi S et al. Occurrence and distribution of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in surface water and sediment of a tropical coastal area (Bay of Bengal coast, Bangladesh). *Sci Total Environ.* 2016; 571: 1089-104.
- Habibullah-Al-Mamun Md, Kawser Ahmed Md, Raknuzzaman M, Saiful Islam Md, Mohammad Ali M, Tokumura M et al. Occurrence and assessment of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in commonly consumed seafood from the coastal area of Bangladesh. *Mar Pollut Bull.* 2017; 124(2): 775-85.
- Higgins CP, Field JA, Criddle CS, Luthy RG. Quantitative determination of perfluorochemicals in sediments and domestic sludge. *Environ Sci Technol.* 2005; 39(11): 3946–56.
- Kannan K, Corsolini S, Falandysz J, Oehme G, Focardi S, Giesy JP. Perfluorooctanesulfonate and related Fluorinated Hydrocarbons in Marine Mammals, Fishes and Birds from Coasts of the Baltic and the Mediterranean Seas. *Environ Sci Technol.* 2002; 36: 3210-16.
- Kiyama R, Wada-Kiyama Y. Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. *Environ Int.* 2015; 83: 11-40.
- Llorca M, Farré M, Picó Y, Barceló D. Analysis of perfluorinated compounds in sewage sludge by pressurized solvent extraction followed by liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2011; 1218(30): 4840-6.
- Luebker DJ, Hansen KJ, Bass NM, Butenhoff JL, Secat AM. Interactions of fluorochemicals with rat liver fatty acid-binding protein. *Toxicol.* 2002; 15(3): 175-85.
- Martín J, Santos JL, Aparicio I, Alonso E. Determination of hormones, a plasticizer, preservatives, perfluoroalkylated compounds, and a flame retardant in water samples by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of a floating organic drop. *Talanta.* 2015; 143: 335-43.
- Martín J, Zafra-Gómez A, Hidalgo F, Ibáñez-Yuste AJ, Alonso E, Vilchez JL. Multi-residue analysis of 36 priority and emerging pollutants in marine echinoderms (*Holothuria tubulosa*) and marine sediments by solid-liquid extraction followed by dispersive solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Talanta.* 2017;166:336-48.

- Martin JW, Smithwick MM, Braune BM, Hoekstra PF, Muir DCG, Mabury SA. Identification of long chain perfluorinated acids in biota from the Canadian arctic. *Environ Sci Technol.* 2004; 38: 373-80.
- Matsuo Y. Synthesis structure and properties of intercalation compounds containing perfluoroalkyl groups. *J Fluorine Chem.* 2007; 128: 336-43.
- Moody CA, Field JA. Perfluorinated Surfactants and the Environmental Implications of Their Use in Fire-Fighting Foams. *Environ Sci Technol.* 2000; 34(18): 3864-70.
- Novelli A, Losso C, Ghetti PF, Ghirardini AV. Toxicity of tributyltin and triphenyltin to early life-styles of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). *Environ Toxicol Chem.* 2002; 21: 859–864.
- Oi Y, Hu S, Huo S, Xi B, Zhang J, Wang X. Spatial distribution and historical deposition behaviors of perfluoroalkyl substances (PFASs) in sediments of Lake Chaohu, a shallow eutrophic lake in Eastern China. *Ecol Indic.* 2015; 57: 1-10.
- Pan Y, Shi Y, Cai Y. Determination of perfluorinated compounds in soil, sediment and sludge using HPLC-MS/MS. *Environ Chem.* 2010; 29 (3): 519-523.
- Rahman-Kabir E, Sharfin-Rahman M, Rahman-Rahman I. A review on endocrinedisruptors and their possible impacts on human health. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2015; 40(1): 241-58.
- Schröder HF. Determination of fluorinated surfactants and their metabolites in sewage sludge samples by liquid chromatography with mass spectrometry and tandem mass spectrometry after pressurised liquid extraction and separation on fluorine-modified reversed-phase sorbents. *J Chromatogr A.* 2003; 1012(1): 131-51.
- Sun T-F, Xiang L, Chen L, Xiao T, Mo C-H, Li Y-W et al. Research Progresses of Determination of Perfluorinated Compounds in Environmental Water and Solid Samples. *Chinese J Anal Chem.* 2017; 45(4): 601-10.
- Takino M, Daishima S, Nakahara T. Determination of perfluorooctane sulfonate in river water by liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization mass spectrometry by automated on-line extraction using turbulent flow chromatography. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2003; 17(5): 383-90.
- Taniyasu S, Kannan K, So MK, Gulkowska A, Sinclair E, Okazawa T et al. Analysis of fluorotelomer alcohols, fluorotelomer acids, and short- and long-chain perfluorinated acids in water and biota. *J Chromatogr A.* 2005; 1093(1-2): 89-97.
- Verderame M, Scudiero R. Estrogen-dependent, extrahepatic synthesis of vitellogenin in male vertebrates. *C R Biol.* 2017; 340: 139-44.

- Vestergren R, Ullah S, Cousins IT, Berger U. A matrix effect-free method for reliable quantification of perfluoroalkyl carboxylic acids and perfluoroalkane sulfonic acids at low parts per trillion levels in dietary samples. *J Chromatogr A*. 2012; 1237: 64-71.
- Villagrasa M, López De Alda M, Barceló D. Environmental analysis of fluorinated alkyl substances by liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry: a review. *Anal Bioanal Chem*. 2006; 386(4): 953-72.
- Villaverde-de-Sáa E, Racamonde I, Quintana JB, Rodil R, Cela R. Ion-pair sorptive extraction of perfluorinated compounds from water with low-cost polymeric materials: Polyethersulfone vs polydimethylsiloxane. *Anal Chim Acta*. 2012; 740: 50-57.
- Wang Q-W, Yang G-P, Zhang Z-M, Jian S. Perfluoroalkyl acids in surface sediments of the East China Sea. *Environ Pollut*. 2017; 231(1): 59-67.
- Yamashita N, Kannan K, Taniyasu S, Horii Y, Okazawa T, Petrick G et al. Analysis of perfluorinated acids at parts-per-quadrillion levels in seawater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ Sci Technol*. 2004; 38(21): 5522-8.

WEBGRAFÍA

<http://articulos.mercola.com/sitios/articulos/archivo/2015/06/11/productos-con-compuestos-perfluorados.aspx>

<http://espanol.mercola.com/boletin-de-salud/los-peores-disruptores-endocrinos.aspx>

http://www.alsglobal.es/noticias/ANALISIS-COMPUESTOS-PERFLUORADOS--PFCs-EN-AGUA_407

<http://www.drlopezheras.com/2014/05/disruptores-endocrinos-toxicos-en-comida-cosmeticos.html>

<http://www.hogarsintoxicos.org/es/riesgos/compuestos-perfluorados>

http://www.idaea.csic.es/attachments/194_Damia_Barcelo.pdf

http://www.vivosano.org/es_ES/Información-para-tu-salud/Entorno-y-Medio-ambiente/Mi-entorno/Disruptores-endocrinos.aspx

<https://www.asturnatura.com/articulos/equinodermos/holoturias.php>